

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de ciencias

Departamento de Biología Molecular

Análisis de los genes y mecanismos que median las funciones
de las proteínas Spalt en el ala de *Drosophila melanogaster*

Memoria presentada por Mercedes Martín Fernández, licenciada en Biología, para optar
al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2016

Esta tesis ha sido realizada en:

Departamento de Desarrollo y Diferenciación

Centro de Biología Molecular Severo-Ochoa (CSIC-UAM) Madrid

Director y Tutor: Prof. José Félix de Celis Ibeas

Diseño e ilustración de la portada: Irene Córdoba Cámara

“ Lo que no se puede explicar tortura la mente”

A mi abuela.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN	17
El ala de <i>Drosophila</i> como modelo	19
Formación del patrón de venas del ala	21
La ruta Dpp y la regulación de la expresión de Spalt	22
El complejo Spalt	23
Función de los genes <i>sal</i> durante el desarrollo del ala	25
La ruta JNK	26
Sal y los mecanismos de regulación de la expresión génica	27
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Cultivo de <i>Drosophila melanogaster</i>	37
2. Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i>	37
3. Tinción inmunohistoquímica de tejidos larvarios	38
4. Microarray de expresión	39
5. Síntesis de sondas de ARN	39
6. Hibridaciones <i>in situ</i> de tejidos larvarios	40
7. Preparación de muestras y tratamiento de imágenes	41
8. Generación de líneas transgénicas	41
8.1 <u>Construcción de las Líneas UAS-optix y UAS-Flag-optix</u>	41
8.2 <u>Generación de las líneas RR-GFP</u>	42
8.3 <u>Deleciones</u>	42

9. Análisis de Ontología Génica	43
10. Inmunoprecipitación de cromatina	43
10.1 <u>Extracción y fijación de la cromatina.</u>	43
10.2 <u>Inmunoprecipitación, aislamiento y amplificación del ADN</u>	44
10.3 <u>Marcaje con fluorocromos, hibridación y escaneado del array.</u>	44
10.4 <u>Procesamiento bioinformático</u>	44
11. Análisis de marcas epigenéticas	45
12. Inmunoprecipitación de proteínas e inmunodetección tras electroforesis	45
RESULTADOS	49
1. Búsqueda de genes candidatos a ser regulados por Sal	51
1.1 <u>Análisis de la expresión génica mediante microarrays en discos de ala silvestre y en discos con expresión reducida de los genes Sal</u>	51
1.1.1 Establecimiento y análisis de los genotipos a utilizar	51
1.1.2 Análisis de la expresión génica: Microarrays	53
1.2 <u>Análisis de expresión los genes candidatos a ser regulados por Sal</u>	61
1.2.1 Estudio de la expresión de los genes activados por Sal	61
1.2.2 Estudio de la expresión de los genes reprimidos por Sal	63
2. Análisis funcional de genes regulados por Sal	68
2.1 <u>Análisis del requerimiento funcional de los genes candidatos durante la formación del ala de <i>Drosophila</i></u>	69
2.1.1 Requerimientos funcionales de los genes candidatos a ser activados por Sal.	69
2.1.2 Requerimiento de los genes candidatos a ser reprimidos por Sal	70
2.2 <u>Análisis de Ontología Génica (GO)</u>	71
2.3 <u>Análisis de la regulación de la posición de la vena L2 del ala de <i>Drosophila</i></u>	76
2.3.1 <i>optix</i> como mediador de la posición de la vena L2	76
2.3.2 Estudio de la regulación génica de <i>knirps</i> .	78

2.3.3 Aristaless participa en la activación de Kni.	80
2.4 <u>Regulación de la ruta JNK en la región central del ala.</u>	81
2.4.1 Estudio de la expresión de <i>egr</i> y su respuesta a la falta de Sal	82
2.4.2 Papel de Sal en la regulación de la ruta JNK.	83
2.4.3 Activación de la ruta JNK mediada por Dpp.	84
3. Identificación del mecanismo molecular de regulación génica por Sal	84
3.1 <u>Inmunoprecipitación de cromatina asociada a Salm</u>	85
3.2 <u>Búsqueda de secuencias que responden a Sal</u>	86
3.3 <u>Modificaciones epigenéticas mediadas por Sal.</u>	94
3.3.1 Búsqueda de marcas epigenéticas en los genes diana de Sal.	94
3.3.2 Análisis genético de la interacción de Sal con proteínas remodeladoras de la cromatina.	95
3.3.3. Estudio de la interacción directa entre Salm y Sir2	99
DISCUSIÓN	101
Búsqueda de genes diana de las proteínas Sal	103
Requerimiento funcional de genes seleccionados	105
Estudio de Ontología Génica	106
Posicionamiento de la vena L2	107
Regulación de la ruta JNK por Sal durante el desarrollo del ala	108
Búsqueda de regiones de ADN reconocidas por Sal	108
Modificaciones epigenéticas mediadas por Sal	110
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA	117
AGRADECIMIENTOS	131
ANEXOS	137
ANEXO 1. Material suplementario.	139
ANEXO 2. Publicaciones.	141

a-cv: anterior crossvein.	L1-6: Venas Longitudinales 1-6.
ADN: Acido Desoxiribonucleico.	LSD1: Lysine-specific histone demetilase 1.
Al: Aristaless.	Mad: Mothers against Dpp.
Ap: Apterous.	Med: Medea.
ARN: Ácido Ribonucleico.	N: Notch.
ARNi: ARN interferente.	NuRD: Nucleosome Remodeling Deacetylase.
ARNm: ARN mensajero.	O: Other; clase fenotípica que incluye otro tipo de cambios.
BMP: Bone Morphogenetic Proteins.	p-cv: posterior crossvein.
Brk: Brinker.	Puc: Puckered.
Bsk: Basket.	S-P: Size-Pattern; clase fenotípica donde se modifica el tamaño y el patrón de simultaneaente.
CFP: Cian Fluorescent Protein.	S: Size; clase fenotípica donde se modifica el tamaño del ala.
CRM: Cis Regulatory Modules.	Sal-: Candidatos a ser activados por Sal.
Dad: Daughters against dpp.	Sal: Complejo Spalt.
Dpp: Decapentaplegic.	Sal+: Candidatos a ser reprimido por Sal.
EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.	Sall: Spalt-like.
Egr: Eiger.	Salm: Spalt major.
FasIII: Fasciclina III.	Salr: Spalt related.
FC: fold-change.	SBC: Sal Best Candidates.
FDR: False Discovery Rate	Shn: Schnurri.
GFP: Green Fluorescent Protein.	TNF: Factor de Necrosis Tumoral.
GO: Ontología Génica.	TSS: Lugares de inicio de la transcripción.
HAT: Histone Acetil Transferase.	UTR: región no traducida del gen.
HDAC: Histone Deacetylase.	V: Vein; clase fenotípica donde se modifica el patrón normal de venas.
Hh: Hedgehog.	Vg: Vestigial.
Iro: Iroquois.	
JNK: Quinasas c-Jun N-terminal.	
Kni: Knirps.	

SUMMARY

The *Drosophila spalt* genes (*spalt-major* and *spalt-related*) encode conserved Zn-fingers transcription factors which expression is activated by the Dpp/BMP signalling pathway in the wing disc. They are required for cell survival, cell cycle progression, epithelial integrity and vein pattern formation, and mediate most of the Dpp/BMP functions during wing development. The identification of Spalt target genes and the analysis of their functions are critical steps toward understanding the genetic control of wing disc development by BMP/Dpp signalling. In this thesis we identified using microarray experiments a considerable change in the transcriptional landscape of the imaginal wing disc in response to the loss of *spalt* expression. We also study the *in situ* expression of those genes which expression varied significantly as a consequence of *spalt* loss of function. These approaches led us to identify a group of candidate Spalt targets that include positively and negatively regulated genes. To address the contribution of each of these genes to the Spalt function, we analysed the wing phenotypes caused by the reduction of their expression, and we were able to find a group of potential mediators of Sal activity. We focussed our analysis on a candidate, *optix*, examining its role in the patterning of the L2 vein; we identified a novel mechanism linking Spalt function with the regulation of the L2-determining gene *knirps*. We also analysed the relationship between JNK pathway activation and BMP/Dpp activity in the wing disc, describing a novel link between these two pathways through which BMP/Dpp activates JNK signalling and Spalt represses this activation by regulating the expression of the JNK pathway ligand *eiger*. Finally, we also addressed the mechanisms involved in the regulation of gene expression by Spalt proteins. We identified 9 DNA regions that drive reporter gene expression in response to Spalt, and describe an A/T-rich sequence enriched in these fragments. In this context, we identified the proteins Caf1-55, Sap130 and MEP-1 as critical components of the transcriptional repression mechanism mediated by Spalt-m.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo consiste en la generación de diversidad celular organizada en patrones espaciales característicos para cada tejido. Las propiedades de cada célula están determinadas en cada momento por el conjunto de genes que expresa, su “apogenoma” (García Bellido, 1985). Los perfiles de expresión génica característicos de cada célula están a su vez determinados por los mecanismos de regulación de la transcripción del ADN, siendo el resultado del diálogo entre secuencias reguladoras presentes en el ADN y familias de proteínas capaces de interaccionar con ellas. Las proteínas que reconocen regiones específicas en el ADN son los factores de transcripción, los cuales actúan como activadores o represores de la expresión génica. Un grupo de factores de transcripción con funciones clave durante el desarrollo son aquellos regulados por rutas de señalización celular, ya que proporcionan a las células la capacidad de responder al contexto celular en el que se encuentran. En general, estos factores de transcripción actúan de manera combinatorial con otros reguladores de la expresión génica, aumentando de esta manera el repertorio de respuestas transcripcionales que caracterizan a los patrones de expresión específicos de tejido o de momento del desarrollo.

Los componentes y procesos moleculares y celulares que rigen el desarrollo están conservados en diferentes organismos. Esto nos permite utilizar organismos sencillos como modelo para el estudio de estos mecanismos. El ala de *Drosophila melanogaster* nos brinda un sistema experimental donde estudiar la conexión entre la señalización celular, la regulación de la expresión génica y la generación de patrones de diferenciación en un epitelio en desarrollo. En este modelo experimental de desarrollo epitelial, el objetivo de nuestro trabajo será entender cómo los factores de transcripción de la familia Spalt regulan la expresión génica para determinar la formación de la región central del disco imaginal de ala.

El ala de *Drosophila* como modelo

El ala, al igual que la mayoría de los tejidos cuticulares de la mosca, deriva de epitelios larvarios llamados discos imaginales (Figura 1). Los discos imaginales se especifican a partir de grupos de células del ectodermo embrionario (Cohen et al., 1993), y durante los su-

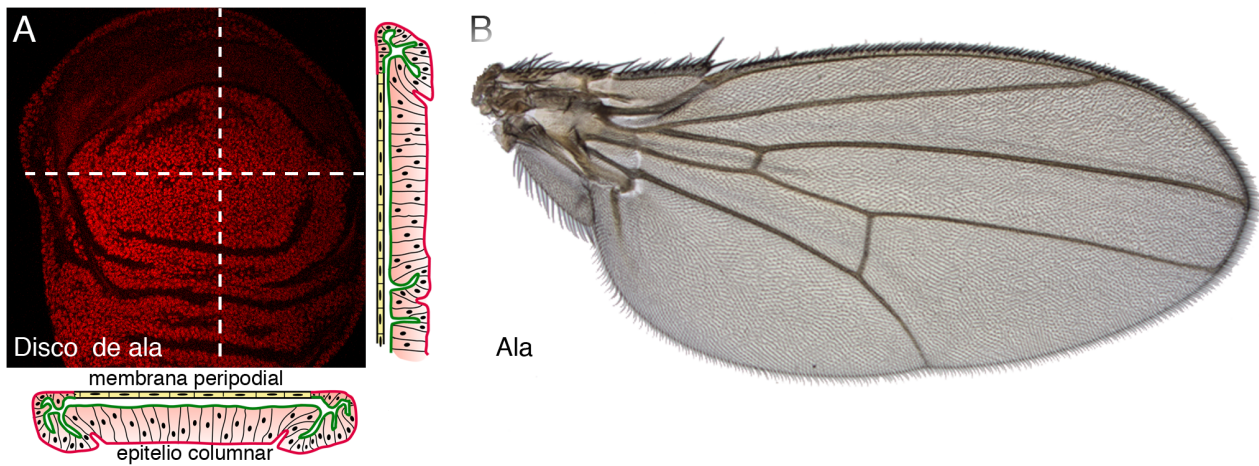


Figura 1. Disco imaginal de ala y ala de *Drosophila*. (A) Disco de ala de tercer estadio larvario con tinción nuclear (rojo), se representan esquemáticamente las vistas ortogonales de un corte sagital (derecha) y uno tangencial (debajo) a la altura de las líneas discontinuas (cedido por C. Molnar y JF de Celis). (B) Ala silvestre de *Drosophila melanogaster*.

cesivos estadios larvarios proliferan y se especifican sus patrones de diferenciación (Klein, 2001). Cada disco imaginal consta de dos epitelios, uno columnar pseudoestratificado que dará lugar a las estructuras adultas y uno escamoso, la membrana peripodial, que es necesaria para la correcta eversión del disco durante la metamorfosis (Figura 1A) (Fristrom y Fristrom, 1993; Pastor-Pareja et al., 2004).

El desarrollo del disco imaginal de ala implica la coordinación de dos procesos: proliferación celular, que incrementa progresivamente el tamaño del epitelio, y división del disco en territorios con identidades genéticas individuales. En el control de ambos procesos juegan un papel central diferentes rutas de señalización que actúan de una manera coordinada en

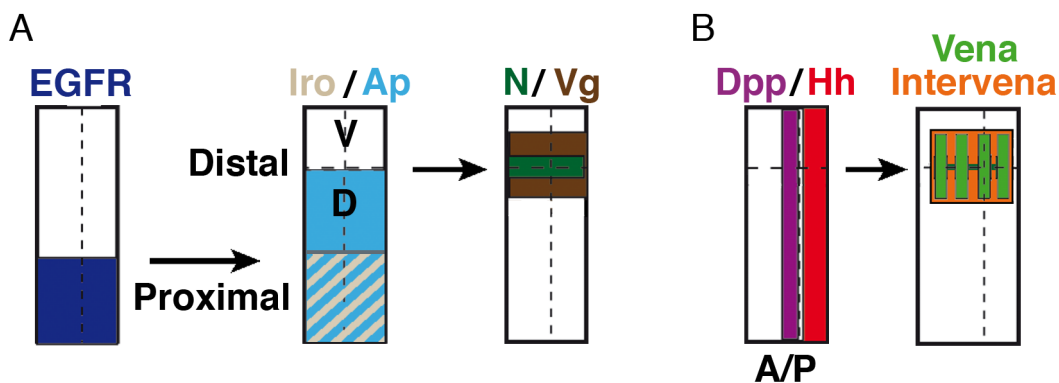


Figura 2. Esquema de los dominios de activación de las rutas de señalización que operan durante el desarrollo del disco de ala. (A) EGFR (azul) se activa en la región más proximal del disco y regula la expresión de *apterous* (Ap; celeste) e *Iroquois* (Iro; gris). El borde de expresión de Ap corresponderá al borde entre los compartimentos dorsal (D) y ventral (V), donde se activará la ruta de señalización de Notch (N, verde). La actividad de esta ruta es necesaria para la iniciación de la expresión de *vestigial* (Vg; marrón), que determina la región de ala. (B) En el compartimento posterior (P) se expresa Hedgehog (Hh; rojo) que activa la expresión de Decapentaplegic (Dpp; morado) en células anteriores al borde A/P. La actividad de ambas rutas de señalización divide el primordio de ala en regiones de vena (verde) e intervena (naranja).

el tiempo y el espacio (Klein, 2001). Así, en el caso del disco de ala, durante el primer estadio larvario, la ruta EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico) regula la expresión de los factores de transcripción Apterous (Ap) e Iroquois (Iro) en la región proximal del disco, y permite diferenciar dos territorios en el epitelio (proximal y distal) que más tarde corresponderán al tórax y al ala (Gomez-Skarmeta et al., 1996; Simcox, 1997)(Figura 2A). Posteriormente, la ruta de Notch (N) se activa en las células situadas en el borde de expresión de Ap, donde regula la expresión de Vestigial (Vg) iniciándose la especificación del primordio del ala dentro del dominio distal del disco (Figura 2A) (Kim et al., 1996). Simultáneamente a la especificación de territorios en el eje próximo-distal, las rutas de señalización Hedgehog (Hh) y Decapentaplegic (Dpp) dividen el territorio de ala en el eje anterior-posterior, lo que determinará las regiones de vena e intervena que caracterizan al ala adulta (Figura 2B) (de Celis et al., 1996; Nellen et al., 1996; Vervoort et al., 1999; Mohler et al., 2000). Se conoce bastante acerca de la función de las diferentes rutas de señalización durante el desarrollo del ala, y se dispone de una gran cantidad de herramientas experimentales para manipular su actividad, lo que hace de este sistema un excelente modelo para el estudio de la regulación génica y su relación con la actividad de las rutas de señalización celular.

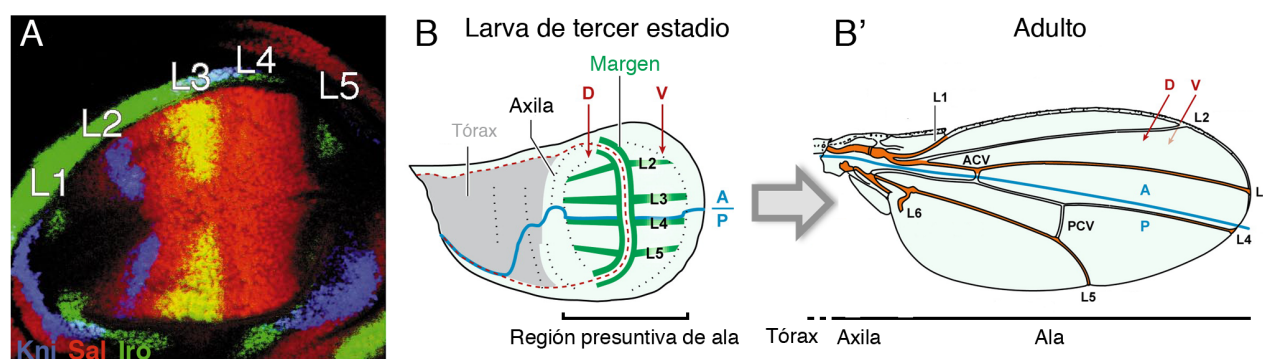


Figura 3. Desarrollo de las venas del ala de *Drosophila melanogaster*. (A) Expresión de Sal (rojo) en la región central, Iro (verde) en los territorios de venas L1, L3 y L5 y Kni (azul) en el de vena L2 en un disco de ala de tercer estadio larvario (de Celis and Barrio, 2000). (B) Representación esquemática de un disco de ala de tercer estadio larvario donde se señalan las regiones que darán lugar al tórax, la axila y el ala, así como los bordes de compartimento dorsal/ventral (D/V en rojo) y anterior/posterior (A/P en azul). En verde se muestran las células que darán lugar a las venas y el margen de ala. (B') Representación esquemática de un ala adulta donde se señalan las venas (L1-L6) así como los compartimentos A, P, D y V.

Formación del patrón de venas del ala

Las venas son los elementos más característicos del ala de *Drosophila*, y consisten en estructuras lineales formadas por células que presentan una menor superficie apical y que diferencian una cutícula más pigmentada que el resto de las células del ala (Garcia-Bellido y de Celis, 1992). En el ala de *Drosophila* encontramos 5 venas longitudinales completas (L1-5), una vena longitudinal incompleta (L6) y dos venas transversales (a-cv y p-cv) (Figura 3). Todas las venas se diferencian utilizando los mismos procesos, en los que participan las

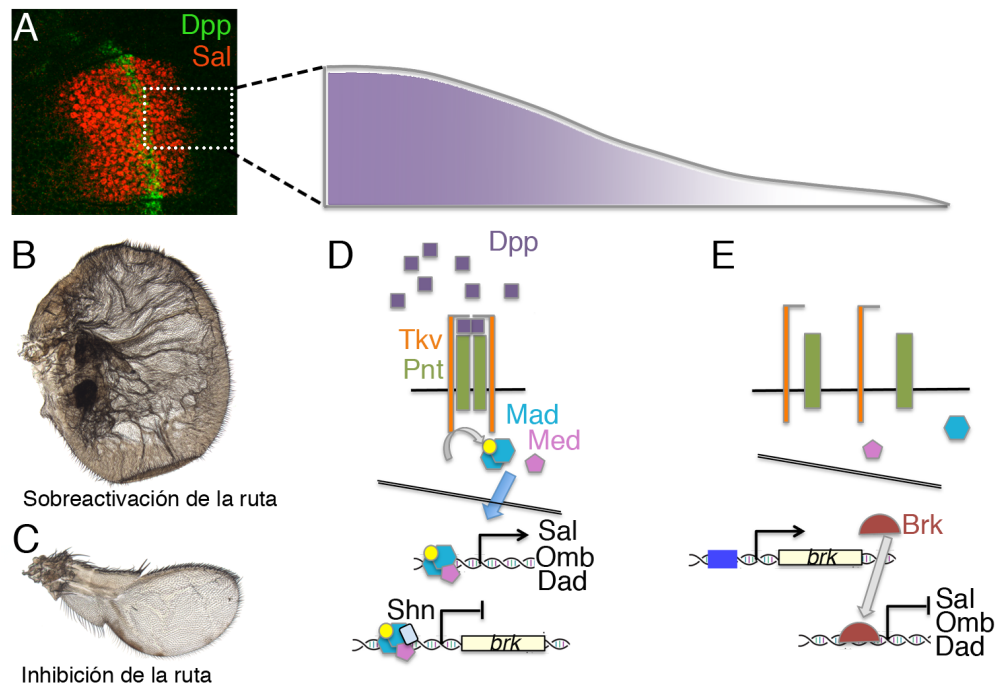


Figura 4. Ruta de señalización Dpp en el disco de ala. (A) Expresión en la región presuntiva de ala de Dpp (ligando de la ruta; verde) y de Salm (diana de la ruta; rojo). Dpp difunde desde el borde A/P (degradado morado) a regiones anteriores y posteriores al borde A/P. (B) Ala resultado de la actividad generalizada de la ruta Dpp. (C) Ala resultado de la falta de actividad de la ruta. (D) Representación esquemática de los componentes de la ruta Dpp en células en las que está activada. Dpp (Morado) interacciona con los receptores Thickveins (Tkv; naranja) y Punt (Pnt; verde), estos fosforilan a Mad (turquesa), lo que permite su interacción con Medea (Med; rosa), y la traslocación de estos complejos al núcleo, donde promueven la transcripción de sus dianas (Sal, Omb y Dad). Los complejos Mad/Med también pueden interaccionar con Shn, junto al cual reprimen la transcripción de *brk*. (E) En condiciones de inactividad de la ruta se expresa Brk (granate), el cual reprime a las dianas de la ruta.

rutas EGFR y Dpp durante el desarrollo larvario y pupal, respectivamente (Sturtevant et al., 1993; de Celis, 1998; Guichard et al., 1999). Sin embargo, cada vena se determina de manera única mediante la función de factores de transcripción específicos que se expresan de manera restringida en cada territorio presuntivo de vena (Figura 3A). En el caso de las venas L3 y L4, su proceso de formación está dirigido por la ruta de señalización de Hh (Vervoort et al., 1999; Mohler et al., 2000; Mullor et al., 1997), cuya actividad directamente especifica la vena L3 regulando la expresión de los genes del complejo Iro (Gomez-Skarmeta et al., 1996), y la intervena L3/L4 regulando la expresión del factor de transcripción Knot (Vervoort et al., 1999). Por su parte, Knot regula la expresión en este territorio del ligando del receptor EGFR Vein, cuya función es necesaria para la formación de la vena L4 (Crozatier et al., 2002). Por otra parte, las venas L2 y L5 se especifican por la actividad de la ruta Dpp, que a través de sus genes diana *spalt major* (*salm*) y *spalt related* (*salr*) participa en el posicionamiento de estas venas en los compartimentos anterior y posterior, respectivamente (Biehs et al., 1998; de Celis y Barrio, 2000).

La ruta Dpp y la regulación de la expresión de Spalt

En el borde A/P la señalización de Hh dirige la expresión de Dpp, el ligando de la vía

BMP/Dpp, en las células anteriores al borde (Affolter y Basler, 2007). Por su parte, la proteína Dpp activa la señalización de la ruta en la región central del ala, incluyendo células anteriores y posteriores a su territorio de expresión (Figura 4A) (Entchev et al., 2000; Teleman y Cohen, 2000). La actividad de la ruta Dpp en este dominio es necesaria tanto para el crecimiento como para la correcta formación del patrón del ala (Figura 4B-C). En la región central del ala, donde está activa, sus mediadores transcripcionales Mothers against Dpp (Mad) y Medea (Med) promueven la expresión de *omb* (Grimm y Pflugfelder, 1996), de los genes del complejo *spalt* (de Celis et al., 1996; Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996; Barrio y de Celis, 2004), y de *daughters against dpp* (*dad*), represor de la ruta que impide la fosforilación de Mad (Tsuneizumi et al., 1997) (Figura 4D). También en esta región, los dímeros Mad-Med interaccionan con Schnurri (Shn) formando un complejo capaz de reprimir la expresión de *brinker* (*brk*) (Figura 4B) (Marty et al., 2000). De esta manera *brk* sólo se expresa en la región lateral, donde reprime la activación de los genes diana de la ruta (Figura 4E). Los genes del complejo *spalt* (*sal*) se regulan directamente por una combinación de las acciones activadoras de Mad-Med y represora de Brk (Barrio y de Celis, 2004), y median las funciones de la vía Dpp en la región central del ala (Organista y de Celis, 2013).

El complejo Spalt

El complejo génico *spalt* en *Drosophila* está formado por dos genes, *salm* y *salr* (Figura 5A). Estos genes codifican para factores de transcripción que se caracterizan por contener varios pares de dedos de zinc C2H2 de unión al ADN y una región conservada de

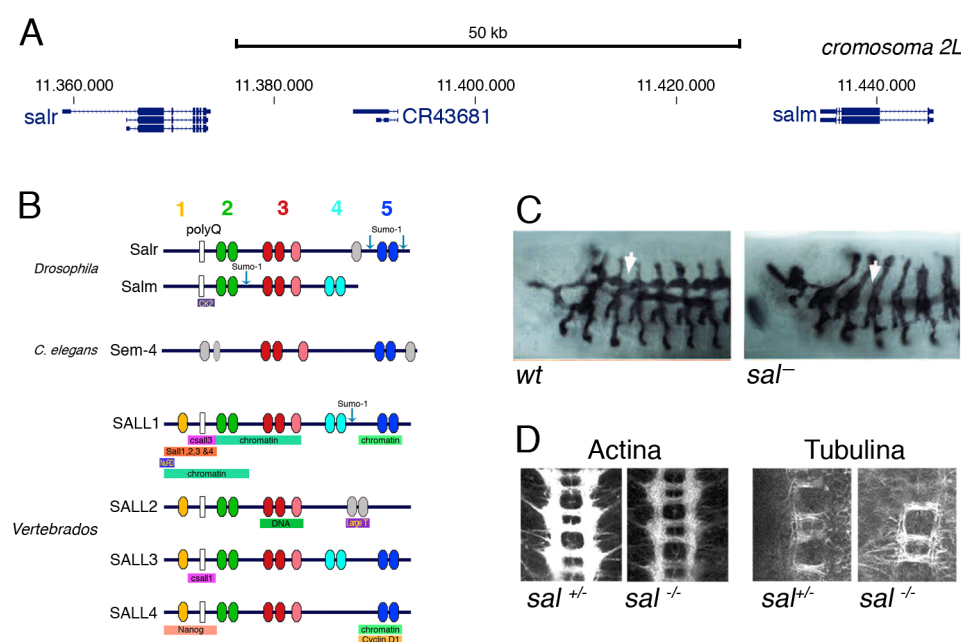


Figura 5. El complejo génico Spalt.

(A) Representación esquemática de los genes *spalt-major* (*salm*) y *spalt-related* (*salr*) en el brazo cromosómico 2L. (B) Esquemas de los dominios conservados en las proteínas Sal en *Drosophila*, *C. elegans* y vertebrados. Los dominios de dedos de Zn C2H2 (1-5) se representan

mediante círculos de colores y el dominio de poliglutaminas (polyQ) mediante un cuadrado blanco. También se representan los lugares de SUMOilación (Sumo-1), así como otras proteínas que interaccionan con Sal [modificado de (de Celis and Barrio, 2009)]. (C) Defectos en las tráqueas en ausencia de *sal* [modificado de (Kühnlein and Schuh, 1996)] al comparar embriones silvestres (wt) y mutantes para *sal* (*sal*⁻) en el estadio 14. (D) SNC de embriones de estadio 16 teñidos para Actina y Tubulina en los que se observa una pérdida de estos marcadores en mutantes *sal* [modificado de (Cantera et al., 2002)].

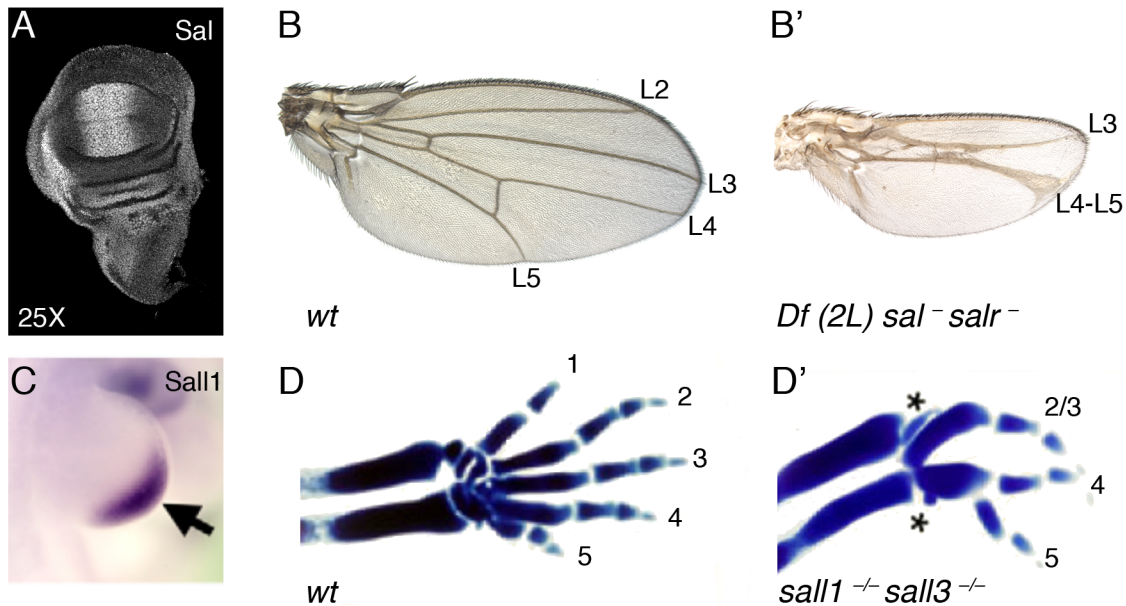


Figura 6. Funciones de Sal en el desarrollo de apéndices. (A) Expresión de Sal en el disco imaginal de ala. (B) Ala silvestre indicando la posición de las venas L2, L3, L4 y L5 (B') Ala mutante para Sal donde se aprecia la reducción de tamaño, la ausencia de vena L2 y la fusión de las venas L4 y L5. (C) Expresión de Sall1 en el primordio de pata de ratón. Esqueleto del autopodio de ratón silvestre (D) y Fusión de carpos y metacarpos en el doble mutante Sall1/Sall3 de (Kawakami et al., 2009).

poliglutaminas que permite su interacción con otras proteínas (Figura 5B) (Barrio et al., 1996; de Celis y Barrio, 2009). Encontramos representantes de los genes *sal* a lo largo de la evolución, desde el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Sem-4), hasta vertebrados, donde existen 4 genes *sal* (Sall1-4) (Figura 5B) (Kühnlein et al., 1994; de Celis y Barrio, 2009). Estudios en vertebrados han descrito sitios de interacción de Sall1-4 con la cromatina y el ADN, así como dominios de interacción con otras proteínas (de Celis y Barrio, 2009). También se ha identificado la existencia de homo y heterodímeros entre proteínas Sall, que interaccionan entre sí a través del sitio de poliglutaminas (de Celis y Barrio, 2009), así como lugares de modificación postraducciona, por SUMOilación, relacionados con la actividad y localización subcelular de la proteína (Sanchez et al., 2010) (Figura 5B). En todos los organismos en que se ha estudiado su función, se ha relacionado a Sal con procesos de formación de patrón y organogénesis, así como con la especificación de destinos celulares. En el caso de *Drosophila*, la función de Sal es necesaria para la correcta formación del sistema traqueal (Kühnlein y Schuh, 1996) y del sistema nervioso (Cantera et al., 2002), entre otros procesos (Figura 5C-D). Sus ortólogos de vertebrados son también necesarios en procesos de organogénesis como ocurre en los sistemas auditivo y renal (Nishinakamura et al., 2001). Estas proteínas están también implicadas en procesos de especificación celular, como es el caso de los fotorreceptores en el disco de ojo-antena de *Drosophila* (Mollereau et al., 2001; Domingos et al., 2004) o en el mantenimiento de las células madre embrionarias de vertebrados (Wu et al., 2006; Wong et al., 2008).

Función de los genes *sal* durante el desarrollo del ala

El estudio del fenotipo de alas mutantes para los genes *sal* ha identificado funciones para estos genes en la regulación de la viabilidad, división celular, integridad epitelial y en la correcta formación del patrón de venas (Figura 6A-B'). Durante la formación del patrón de venas, los genes *sal* juegan un papel importante en el posicionamiento de las venas L2 y L5 (de Celis y Barrio, 2000). En el caso de la vena L5, las proteínas Sal reprimen la expresión de los genes del *iro-C*, restringiéndola a la región presuntiva de la vena L5 en el compartimento posterior. Para la vena L2, las proteínas Sal regulan la expresión de los genes del complejo *knirps* (*kni*), acotando su expresión a la región presuntiva de la vena L2. Estas funciones podría ser similares a la descrita para Sall1 y Sall3 en la especificación del patrón de dígitos

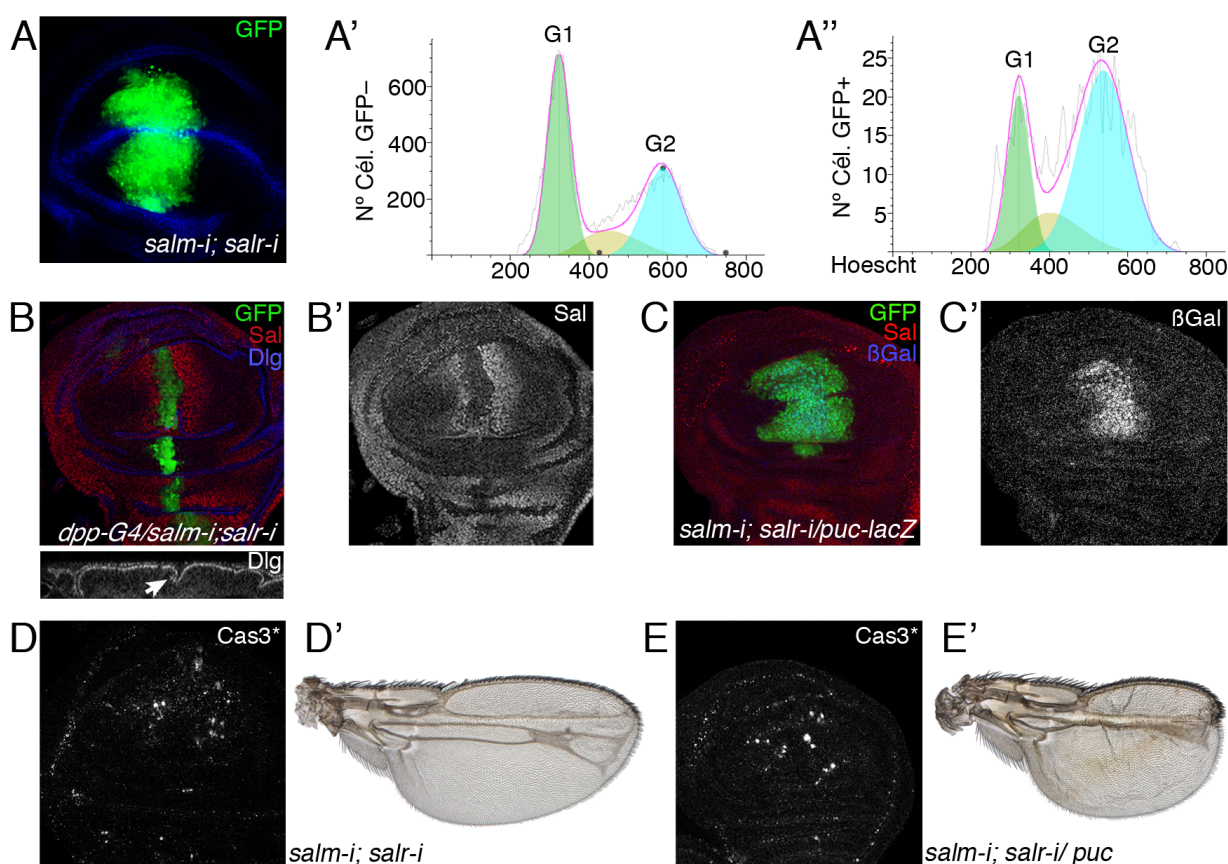


Figura 7. Funciones de Sal en el desarrollo imaginal. (A) Disco de ala de tercer estadio de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 UAS GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* mostrando la localización de Wg en azul y de GFP, en la región donde se expresan los ARNi, en verde. (A'-A'') Perfil del ciclo celular fuera del dominio *sal^{EPV}-Gal4* (A'; GFP-) y dentro de dicho dominio (A'', GFP+). Se observa una acumulación de células *salmi/salri* en fase G2. (B-B') Disco de ala *dpp-G4 UAS-GFP/salm-i; salr-i/+* y surcos epiteliales (flecha en la sección longitudinal inferior) formados en los sitios de confrontación entre células que expresan y no expresan Sal (B'). (C-C') Disco de ala *sal^{EPV}-Gal4 UAS GFP/salm-i; salr-i/puc-LacZ* donde se observa activación ectópica de la ruta JNK en la región central revelada por la expresión de *puc-LacZ* (C'). (D-D') Discos de ala y ala *sal^{EPV}-Gal4 UAS GFP/salm-i; salr-i/+*. (E-E') Discos de ala y ala *sal^{EPV}-Gal4/salm-i; salr-i/UAS-puc*. No se aprecian diferencias entre la apoptosis (Cas3* en D y E) o el fenotipo de las alas (D' y E') (modificado de Organista and de Celis, 2013).

en la extremidad de vertebrados en respuesta a la actividad de *sonic hedgehog (shh)* (Figura 6C-D')(Kawakami et al., 2009).

Además de participar en la formación del patrón de venas, Sal también define las propiedades de proliferación y viabilidad celular de la región central del ala (Organista y de Celis, 2013), aunque los genes que median estas funciones aún no han sido caracterizados. Así, las alas que se desarrollan en la ausencia de *sal* son de menor tamaño que las normales (Figura 6B') y los discos imaginales mutantes para *sal* presentan menos células en mitosis debido a una alteración en la progresión del ciclo celular, detectándose una acumulación de células retenidas en fase G2 (Figura 7A' comparado con A''). Estos discos imaginales también presentan problemas en integridad epitelial, encontrándose modificada la expresión del marcador epitelial Fasciclina III (FasIII) y observándose la formación de surcos en las regiones de confrontación entre territorios con presencia y ausencia de Sal (Figura 7B-B'). Por último, los discos mutantes para *sal* presentan una activación ectópica de la ruta de las Quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (Figura 7C-C') y la aparición de apoptosis en la región central del disco imaginal de ala (Figura 7 D-D'). La activación de la ruta JNK no está relacionada con el tamaño que presentan las alas, ya que cuando se bloquea dicha ruta, las alas siguen presentando un tamaño reducido (Figura 7D-D' comparado con E-E').

La ruta JNK

Es de particular interés la relación entre las proteínas Sal y la ruta de señalización JNK. Esta ruta es necesaria en procesos morfogénicos tales como el cierre dorsal embrionario (Riesgo-Escovar et al., 1996), y la eversión y fusión de los discos imaginales (Martin-Blanco et al., 2000; Pastor-Pareja et al., 2004). La ruta JNK también regula la viabilidad celular en los epitelios imaginales, encontrándose asociada su activación con la inducción de apoptosis (Pérez-Garijo et al., 2004). Generalmente su activación depende del factor de necrosis tumoral (TNF), codificado en *Drosophila* por *eiger (egr)* (Igaki et al., 2002) que reconoce a su receptor (Wengen o Grindelwald) e inicia una cascada de fosforilaciones de quinasas que desemboca en la activación de Basket (Bsk/JNK) (Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013). Además, la activación

de Bsk/JNK puede darse en diferentes puntos de la vía en respuesta a otros estímulos, como son el estrés mecánico o la pérdida de polaridad apico-basal (Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013). Bsk fosforilado es capaz de activar diferentes factores de transcripción entre

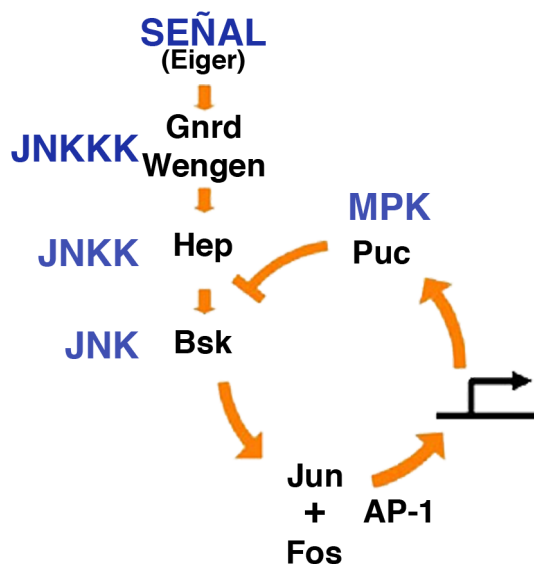


Figura 8. Ruta JNK. Esquema de la ruta de señalización de las Quinasas c-Jun N-terminal (Modificado de imagen del laboratorio de Bohmann).

los que destaca Jun, que en combinación con Fos (Kayak) forma el complejo transcripcional AP-1. Entre los genes diana de AP1 encontramos a *puckered* (*puc*), la fosfatasa que regula negativamente a la ruta desfosforilando a Bsk (Martin-Blanco et al., 1998) (Figura 8).

Sal y los mecanismos de regulación de la expresión génica

Aunque los procesos en los que *sal* está implicado durante el desarrollo del ala han sido identificados, se desconoce a qué genes regula para llevar a cabo estas funciones. Así mismo se ignora el mecanismo mediante el cual se da esta regulación, aunque hay antecedentes que señalan que las proteínas Sal pueden funcionar tanto activando como reprimiendo la transcripción de diferentes genes diana. En la región no codificante del ADN se encuentran regiones, en general conservadas, necesarias para controlar la expresión del ADN codificante. Estas secuencias se denominan elementos reguladores en *cis* (CRM, *cis regulatory modules*). Según las proteínas que interaccionan con estos módulos y la función que tienen en la regulación, diferenciamos los siguientes CRMs:

Promotores basales: son las secuencias mínimas de ADN que permiten el inicio de la transcripción. Es donde se ensamblan los elementos de la maquinaria de transcripción, como la ARN polimerasa II y diferentes factores de transcripción necesarios para la estabilidad de este complejo. En general estas secuencias se encuentran muy próximas al sitio de inicio de la transcripción (Baumann et al., 2010).

Potenciadores: son secuencias de ADN donde se unen los factores de transcripción que determinan cuándo y cuánto se usa un promotor. Estas secuencias pueden estar muy alejadas del promotor y son las responsables de la regulación espacio-temporal de la transcripción de un gen. Pueden funcionar de manera combinada con otros potenciadores y por tanto integran la actividad de diferentes factores de transcripción (Riethoven, 2010).

Silenciadores: secuencias que impiden la utilización de un determinado promotor (Riethoven, 2010).

Aisladores: limitan y acotan el segmento de ADN en el que los potenciadores pueden actuar. De esta manera contribuyen a subdividir la cromatina en módulos independientes en cuanto a la regulación de la transcripción (Riethoven, 2010).

Para llevar a cabo el control de la transcripción, es también necesario que la cromatina se encuentre en una conformación que permita o impida que la maquinaria de transcripción se ensamble en el promotor. Esta regulación viene dada por diferentes modificaciones en las colas N-terminales de las histonas. Ya que estudios previos han identificado que las proteínas Sall pueden funcionar tanto activando como reprimiendo la transcripción, es muy posible que, dependiendo del contexto celular y/o del gen diana en cuestión, sean capaces de interaccionar con diferentes cofactores que definan tanto estados de activación como de represión de un determinado gen. De manera general, los activadores pueden funcionar si-

guiendo dos estrategias: interaccionando con componentes de los complejos HAT (*Histone Acetil Transferase*) que acetilan las colas de las histonas haciendo que la conformación de cromatina sea accesible, o reclutando al complejo *Mediator*, que promueve la interacción entre los factores de transcripción, el promotor y las subunidades de la maquinaria de transcripción (Kagey et al., 2010).

Entre las estrategias que siguen los represores transcripcionales encontramos la competición con los activadores por la unión a sitios solapantes del ADN. Éste es el caso de Brk y Mad-Med, que pueden interaccionar con secuencias solapantes de manera que la proporción de Brk frente Mad-Med determina la represión o activación del gen diana (Kirkpatrick et al., 2001). También es posible la represión de la maquinaria de transcripción, que puede darse por una interacción directa con esta maquinaria, como ocurre en procariotas, o por el reclutamiento de modificadores de la cromatina que impiden la unión al promotor de la ARN polimerasa (Weake y Workman, 2010). En el caso de las proteínas Sall, se ha visto que tanto Sall1 como Sall4 son capaces de interaccionar con el complejo remodelador de la cromatina NuRD, que lleva a cabo una desacetilación de las histonas (Lauberth y Rauchman, 2006; Lu et al., 2009), y también que Sall4 es capaz de reclutar LSD1 (*lysine-specific histone demethylase 1*) a sus dianas, alterando el estado de metilación de la cromatina (Liu et al., 2013).

En general, la característica principal que confiere a un factor de transcripción su especificidad por un gen diana es la secuencia de ADN que es capaz de reconocer (Rubinstein and de Souza, 2013). Estas secuencias, llamadas sitios de unión, son tremendamente variadas en cuanto al número y orden de las bases que las componen, y comúnmente sólo pueden definirse de una manera laxa, lo que dificulta su identificación (Slattery et al., 2014). Los potenciadores contienen varios sitios de unión para diferentes factores de transcripción en una estructura espacial concreta, que forma lo que se denomina “gramática del potenciador”. Existen dos modelos básicos de la organización de los potenciadores: 1) Modelo del *enhanceosome*, en el que cada uno de los sitios de unión que conforman el potenciador son necesarios para que la regulación se dé, de esta manera los factores de transcripción funcionan de manera sinérgica, y 2) Modelo *billboard* en el que los sitios de unión forman una estructura más laxa, y la falta o cambio de posición de alguno de ellos modifica la funcionalidad del potenciador pero no la elimina (Arnosti y Kulkarni, 2005). Es posible encontrar una combinación de ambos modelos, modelo colectivo de factores de transcripción, en la que en un mismo potenciador encontramos módulos imprescindibles y con una estructura más estricta y regiones más flexibles que pueden modificarse en parte sin afectar a la regulación (Junion et al., 2012). Es de destacar que muchos factores de transcripción se unen de manera débil al ADN, lo que dificulta mucho el estudio de estas interacciones. Se pensaba que estas interacciones no eran funcionales, pero se ha visto que las interacciones débiles o transitorias pueden ser necesarias para el funcionamiento del factor de transcripción (Ramos y Barolo, 2013). Éste es el caso, por ejemplo, de Sall4, en el que mutaciones que incrementan su afinidad por la unión al ADN causan defectos en el desarrollo (Miertus et al.,

2006).

En el caso de las proteínas Sal, se conoce poco sobre qué es lo que reconocen en el ADN para ejercer su función. Estudios previos *in vitro* con Salr de *Drosophila* identificaron una secuencia de ADN rica en A/T (TTATGAAAT) a la que se une reprimiendo la expresión (Barrio et al., 1996). También se ha encontrado una región de unión rica en A/T para Sall1 y Sall4 necesaria para la localización pericentromérica de estas proteínas (Yamashita et al., 2007). Además, Sall2 puede activar la expresión de p16 para regular el ciclo celular uniéndose a una secuencia rica en CG que se encuentra en su promotor (Wu et al., 2015). A pesar de estos antecedentes, hasta ahora no se ha descrito *in vivo* ningún mecanismo general mediante el cual las proteínas Sal reconocen regiones específicas del ADN para regular la expresión génica.

En resumen, los genes *sal* son dianas de una ruta de señalización que promueve el crecimiento del ala y la formación de su patrón de diferenciación, y para entender cómo esta ruta controla dichos procesos es necesario identificar sobre qué genes ejercen su acción las proteínas Sal. De esta manera podremos adjudicar a cada proceso regulado por estas proteínas genes que lo llevan a cabo y así reconstruir la jerarquía genética que subyace al desarrollo del ala iniciada por la ruta de señalización Dpp/BMP. Por otra parte, para entender cómo Sal ejerce sus funciones no sólo es necesario identificar sus genes diana, sino también definir de qué manera estas proteínas llevan a cabo sus funciones como activadores o represores transcripcionales. Por estas razones, en esta tesis nos hemos planteado como objetivos generales una búsqueda de dianas que medien las funciones del complejo Spalt durante el desarrollo epitelial del ala, y el estudio de los mecanismos de regulación de estos genes diana.

OBJETIVOS

1. Búsqueda de genes diana de los factores de transcripción Spalt de *Drosophila melanogaster* y análisis de sus funciones en el desarrollo del ala.
2. Identificación de módulos reguladores de ADN que participen en la respuesta a las proteínas Spalt.
3. Identificación de los componentes de la maquinaria transcripcional que participan junto con Spalt en la regulación de la expresión génica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de *Drosophila melanogaster*

El mantenimiento de las estirpes de *Drosophila* se ha llevado a cabo en un medio de cultivo tipo, preparado con harina, levadura, glucosa, agar y ácido propiónico. El cultivo de las líneas de *Drosophila* se ha realizado en cámaras de temperatura regulada (25°C, 17°C o 29°C) a una humedad del 60%.

2. Estirpes de *Drosophila melanogaster*

Para realizar una expresión controlada espacio-temporalmente de diferentes ARNs nos hemos valido del sistema Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993). Este sistema utiliza el factor transcripcional de levaduras Gal4, que es capaz de interaccionar con las secuencias di-nas UAS (*Upstream Activator Sequence*) y activar la trans-cripción del gen situado en posición 3' de dicha secuencia (Figura 9). Se utilizaron diferen-tes estirpes de *Drosophila* que expresan la proteína Gal4 con patrones espacio-temporales específicos. Estas estirpes se combinaron con otras que, tras la secuencia UAS, contienen las secuencias a expresar.

Se utilizaron las siguien-tes líneas Gal4 y UAS: *nubbin-Gal4* (*nub-Gal4*), *sal^{EPV}-Gal4* (Cruz et al., 2009), *scalloped-Gal4* (*sd-Gal4*), *vestigial-Gal4*

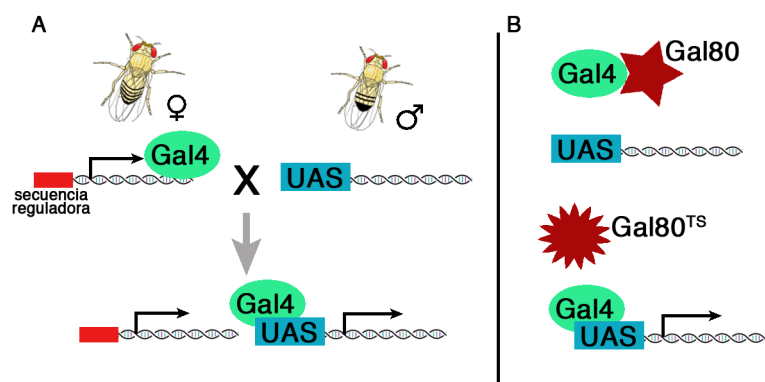


Figura 9. Sistema de expresión génica Gal4/UAS. (A) El cruce entre un portador de la inserción Gal4 y un portador con la inserción UAS origina una descendencia con ambos elementos. En las células en que esté presente la proteína Gal4 se activará la transcripción del gen adyacente a las secuencias UAS. (B) La proteína Gal80 es capaz de reclutar a la proteína Gal4 impidiendo que se una a la secuencia UAS. En el caso de la proteína Gal80^{TS} esta unión sólo puede realizarse a temperatura permisiva, lo que permite modular la activación mediada por la proteína Gal4.

(vg-Gal4), C5-Gal4, UAS-GFP, UAS-lacZ, UAS-salm^{14b}, UAS-dad, UAS-Flag-optix, UAS aris-talles³ (UAS-a^{l3}), UAS a^{l22} y UAS-Salm-CFP-His-Myc (cedida por la Dra. Barrio).

Este sistema de expresión se puede combinar con el sistema Gal80 de levaduras, de forma que cuando esta proteína está presente, se une a Gal4 impidiendo su unión a la secuencia UAS (Figura 9B). En este trabajo se han utilizado las líneas *sal^{EPv}-Gal80.1* y *tub-Gal80^{TS}*. Ésta última expresa una versión termo-sensible de la proteína Gal80 que no es funcional a 29°C.

Los UAS de ARN de interferencia (ARNi) utilizados se indican en la tabla suplementaria 1. En algunos casos se expresó la proteína Dicer2 para aumentar la eficiencia de la interferencia (Dietzlet al., 2007).

3. Tinción inmunohistoquímica de tejidos larvarios

Se diseccionaron larvas de tercer estadio en PBS (*phosphate buffered saline*, NaCl 138 mM/KCl 3 mM/Na2HPO₄ 1'5 mM) y se fijaron en formaldehido al 4%/PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 15 minutos en PBS-Triton X-100 0,3% (PBT). Previamente a la incubación con el anticuerpo, las preparaciones se incubaron en solución de bloqueo PBT-BSA 1% NaCl 250 mM (PBT-BSA) durante 30 minutos seguido de la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en PBT-BSA durante toda la noche a 4°C. Tras retirar la solución del anticuerpo se realizaron 3 lavados de 15 minutos en PBT, antes de incubar con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo diluido en PBT-BSA durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Las muestras se lavaron 3 veces durante 15 minutos con PBT. Los discos imaginales se colocaron en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories) sobre portaobjetos de cristal y cubiertos por cubreobjetos sellados con laca.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Origen	Dilución	Procedencia
Anti-Salm	Rata	1:50	de Celis y Barrio, 2000
Anti-FasIII	Ratón	1:200	Hibridoma Bank
Anti-Kni	Cobaya	1:500	Wu et al., 2001
Anti-AI	Rata	1:50	Campbell et al., 1993
Anti-βGal	Ratón	1:1000	Promega
Anti-Mmpl	Ratón	1:10	Hibridoma Bank
Anti-GFP	Ratón	1:100	Roche

Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488, 555 y 647 anti-conejo, anti-ratón, anti-rata y anti-cobaya de *Invitrogen/Life Tchnologies* (1:200). En los casos indicados se incubaron, junto con los anticuerpos secundarios, Faloidina conjugada con TRITC (tetrameetilrodamina, 1:200, Sigma) para visualizar la Actina filamentosa o To-Pro-3 (1:100, Invitrogen) para visualizar los núcleos.

4. Microarray de expresión

Los ensayos de microarray de expresión se realizaron a partir de 3 réplicas biológicas de discos imaginales de los siguientes genotipos:

sal^{EPv}-Gal4; tub-Gal80^{ts}/UAS-GFP (discos control)

sal^{EPv}-Gal4/UAS-salm-i; tub-Gal80^{ts}/UAS-salr-i (discos experimento)

El ARNm en cada réplica fue aislado a partir de 50 discos imaginales de ala de tercer estadio extraídos y mantenidos a -80°C en solución *RNA later* de Ambion. Los discos se homogeneizaron y se llevó a cabo el aislamiento del ARNm utilizando el protocolo de *TRIzol Reagent* (Ambion). A continuación se realizó un tratamiento con ADNasa (*DNA-freeTM system*; Ambion).

El ensayo de expresión mediante microarrays se llevó a cabo en los laboratorios Bioarray (<http://www.bioarray.es>). Previo a la hibridación se efectuó un análisis de la calidad del ARNm mediante Bioanalyzer utilizando el kit *Eukaryote Total RNA Nano* (Agilent). El marcaje de las muestras se realizó siguiendo el protocolo *Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* v. 6.5 de Agilent. La hibridación se realizó sobre arrays de expresión Agilent diseñados para *Drosophila melanogaster* (ID 043135). En cada array se hibridaron dos muestras diferentes a comparar marcadas con diferentes fluoróforos (Cy3 y Cy5). Para el análisis posterior, los datos se sometieron a una normalización entre todos los arrays a fin de hacer todos los datos comparables. En último lugar se procesaron estadísticamente los datos utilizando Bioconductor con los paquetes para análisis de microarray Limma, Marray, affy, pcaMethods, EMA, GOstats y GSEABase ejecutados bajo el entorno R.

5. Síntesis de sondas de ARN

Para la realización de hibridaciones *in situ* se hicieron sondas de ARN complementarias al ARNm del gen bajo estudio (Tabla suplementaria 2). Se utilizaron librerías de ADNc de la colección de EST (*Expression Sequence Tags*) de BDGP (*Berkeley Drosophila Genome Project*) que contuvieran la secuencia del gen de interés. Los clones de bacterias transformadas con el vector de interés se cultivaron en medio selectivo suplementado con el antibiótico adecuado según la resistencia codificada en el plásmido (cloranfenicol para pOT2 y pOTB7 y ampicilina para pFLC-I). El plásmido se purificó mediante el kit *Wirard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). La identidad de cada ADNc se comprobó mediante la digestión con las endonucleasas de restricción adecuadas y visualización de los fragmentos de ADN resueltos mediante electroforesis en gel de Agarosa 1%. La amplificación del ADNc se realizó mediante PCR utilizando cebadores específicos para cada plásmido que flanquean la zona de clonaje: T7 y SP6 para pOT2 y pOTB7 y T7 y T3 para pFLC-I.

Cuando no se disponía de EST para el gen de interés se amplificaron exones del gen con una longitud entre 500 y 100 pares de bases mediante PCR a partir de ADN genómico de moscas silvestres utilizando cebadores específicos (Tabla Suplementaria 2) a los que se añadieron las secuencias de reconocimiento de las ARN-polimerasas T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) y T3 (ATTAAACCCTCACTAAAGGGA).

El producto de PCR se purificó utilizando *MinElute PCR Purification kit* (Quiagen). Con este ADN se llevó a cabo una reacción de transcripción, en presencia de digoxigenina para el marcaje del ARN, utilizando *DIG-RNA Labeling Mix* (Roche). La reacción de transcripción se llevó a cabo utilizando como molde 200 ng de ADN, con la ARN polimerasa correspondiente, durante 2h a 15°C. Para sondas antisentido se utilizó ARN-polimerasa que reconoce la secuencia situada en el extremo 3' (SP6 para pOT2, T7 para pOTB2 o T3 tanto para pFLC-I como para los productos amplificados a partir de ADN genómico). Para generar sondas sentido se utilizó ARN-polimerasa que reconoce la secuencia situada en el extremo 5' (T7 tanto para pOT2, pFLC-I y los productos obtenidos a partir de ADN genómico, y SP6 para pOTB2). Tras la transcripción se somete la mezcla a un tratamiento con ADNasa a 37°C durante 15 minutos eliminando el ADN que se ha utilizado como molde. Posteriormente, la sonda se precipitó con EDTA 0,5 M, LiCl 1M y Etanol absoluto y se re-suspendió en H₂O libre de nucleasas (50 µl).

6. Hibridaciones *in situ* en tejidos larvarios

Todos los pasos llevados a cabo para realizar hibridaciones *in situ* se realizaron con soluciones libres de nucleasas tratadas con DEPC (Diethyl pirocarbonato, SIGMA).

Se diseccionaron cabezas de larvas de tercer estadio larvario en PBS y se fijaron durante 30 minutos en formaldehído 4%, seguido de 3 lavados de 5 minutos con PBS Tween20 0,1% (PBTw). Posteriormente se realizó una segunda fijación de 20 minutos con Formaldehído 4%/PBTw, seguidos de 3 lavados de 5 minutos con PBTw. Las larvas se almacenan a -20°C en solución de hibridación (HS; Formamida 50%, SSC 5X, ADN de espermatozoos de salmón 100 µl/mg, heparina 50 µg/ml, Tween20 0,1%). Las larvas se pre-hibridaron incubándolas con HS a 55°C durante al menos 2h. Se llevó a cabo la hibridación con 2 µl de sondas de ARN específicas marcadas con digoxigenina (previamente las sondas se desnaturalizaron durante 10 minutos a 80°C) en un volumen final de 100 µl de HS a 55°C durante toda la noche.

Tras la hibridación se hicieron lavados consecutivos a 55°C con una concentración decreciente de HYBE (70%-50%-30%, Formamida 50%, SSC 5X 50%) en PBTw, y se bloquea durante 30 minutos en PBT-BSA antes de la incubación con el anticuerpo antidigoxigenina (1:4000), que reconoce la marca de las sondas, durante 2 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBTw de 15 minutos se procedió al revelado con la solución color (NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tris-HCl pH 9,5 100 mM, Tween20 0,1%) a la que se añadió NBT (4-Nitro Blue Tetrazolium Chloride) y BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato) (ROCHE). El

revelado se llevó a cabo en oscuridad parándose la reacción mediante 3 lavados con PBTw de 15 minutos.

7. Preparación de muestras y tratamiento de imágenes

Los tejidos larvarios sometidos a hibridaciones *in situ* se montaron en glicerol 70%, los tejidos de tinciones inmunohistoquímicas se montaron en Vectashield (Vector Laboratories) y las preparaciones de tejidos cuticulares se montaron en un medio de Láctico-Etanol (6:5) sobre portaobjetos de cristal cubiertos por cubreobjetos y sellados con laca.

Las imágenes de microscopía óptica se tomaron con una cámara Spot acoplada a un microscopio Zeiss Axioplan™. Utilizando un aumento 5X para las alas y un aumento 10X para los discos imaginales. Las imágenes de microscopía confocal se tomaron con un microscopio LSM510 (Zeiss). En el caso de discos imaginales, se utilizó un objetivo de aumento 40X mostrando planos individuales tomados en la posición de máxima intensidad de señal (excepto cuando se indica lo contrario). El procesamiento de las imágenes se realizó con los programas ImageJ64 y Adobe Photoshop CS3.

8. Generación de líneas transgénicas

8.1 Construcción de las líneas *UAS-optix* y *UAS-Flag-optix*

Las construcciones de ADN se realizaron mediante el sistema Gateway (Invitrogen). A partir del EST con la secuencia codificante para el gen *optix* (LD05472) amplificamos el ADNc por PCR utilizando oligonucleótidos específicos que flanquean la región codificante comenzando en el ATG de inicio de la transcripción y acabando en el codón STOP (AGT). Para la inserción por recombinación del producto de PCR en el vector pENTR-D-TOPO (Invitrogen) añadimos al cebador directo la secuencia CACC en el extremo 5' (CACCATGGC-CGTTGGACCGACGG y TCAGACCCGTCGATATCATGTG).

La inserción dirigida del producto de PCR amplificado en el vector pENTR/D-TOPO se realiza mediante recombinación utilizando pENTR™ Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen) y se transforma en bacterias *Escherichia coli* quimio-competentes de alta eficiencia One Shot® TOP10 (Invitrogen). Los clones se seleccionan creciendo las bacterias a 37°C durante toda la noche en placas LB/Agar suplementado con Kanamicina (50 µg/ml). Comprobamos mediante una PCR que los clones positivos contienen la secuencia de interés.

Los clones *pENTR-Optix* se recombinaron con los vectores de destino pTFW (DGRC), para la construcción *UAS-Flag-optix*, que contiene la secuencia de la etiqueta Flag en la región N-terminal, y pTW (DGRC) para la construcción de *UAS-optix*. La reacción de recombinación se llevó a cabo utilizando la LR-Clonasa II™ (Invitrogen) durante 1 hora a 25°C. Tras parar la reacción con proteinasa K durante 15 minutos a 37°C los plásmidos recombinantes se transformaron en bacterias *E. coli* DH5α y se crecieron en placas de LB suplementado con Ampicilina (100µg/ml) durante toda la noche. Se comprobó que los clones positivos porta-

ban el inserto mediante secuenciación con el cebador SVr (GGCATTCCACCACTGCTCCC) llevada a cabo en el Parque Científico de Madrid.

Ambas construcciones fueron inyectadas para su transformación en la línea germinal de embriones *w* de *Drosophila* por el Servicio de Transgénesis de *Drosophila* del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Tras el mapeo de las líneas transformantes, se generaron líneas estables transgénicas *UAS-FLAG-optix* y *UAS-optix*.

8.2 Generación de las líneas RR-GFP.

Para las líneas transgénicas en las que se clonaron potenciadores dirigiendo la expresión de eGFP se procedió de manera similar utilizando el sistema Gateway (invitrogen). Se amplificaron por PCR las regiones seleccionadas utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla Suplementaria 3) y ADN genómico como molde. Los productos de PCR se recombinaron para su inserción en el vector pENTR/D-TOPO. Tras la transformación y análisis de los clones positivos se realizó la recombinación mediante la reacción de LR y su inserción en el vector pHPDesteGFP (Boy et al., 2010). Se secuenciaron los clones positivos utilizando el cebador del vector GFPRv (CTTCGGGCATGGCGGACTTG) y el plásmido se transformó de manera dirigida al cromosoma 3R de moscas *y¹ M[vas-int.Dm]ZH-2A w^{*}; M[3xP3-RFP.attP]ZH-86Fb* (BDSC) utilizando el sistema de integración basado en ϕ C31 (Bischof et al., 2007).

8.3 Deleciones.

Para generar deleciones en regiones reguladoras se procedió de la siguiente manera: se diseñaron cebadores flanqueando la región reguladora con colas que portaban las dianas para las endonucleasas de restricción AvrII, en el cebador 5', y BglII, en el cebador 3'. Además se diseñaron otros dos cebadores que alineaban delante y detrás de la región que se quiere eliminar (delección) a los que se incluye la secuencia diana de la endonucleasa de restricción XhoI (Tabla suplementaria 3). Se realizan distintas PCRs para amplificar los fragmentos necesarios para el clonaje:

PCR del fragmento 5': utilizando los cebadores sentido con la diana para AvrII y el antisentido con la diana para XhoI que alinea con la posición 5' de la secuencia a deleccionar.

PCR del fragmento 3': usando los cebadores sentido, con la diana para XhoI que alinea en posición 3' de la región a deleccionar, y el antisentido con la diana para BglII.

Tras comprobar por electroforesis en gel de agarosa 1% que los productos de PCR tienen el tamaño esperado se purifican mediante el QIAquick PCR purification kit (Quiagen) y se digieren cada uno con las endonucleasas para las que portan dianas. Además digerimos el vector HLz attB (Estella et al., 2008) con las enzimas AvrII y BglII (dianas únicas en el sitio

de clonaje múltiple). Luego se llevó a cabo una ligación con los tres fragmentos: inserto 5', inserto 3' y vector. El producto de la ligación se transformó en la cepa DH5 α de *Escherichia coli* que se crecieron en placas LB suplementado con Ampicilina. Mediante secuenciación se comprobó que el fragmento clonado tenía ausente la región deseada y se transformó de manera dirigida al cromosoma 3R de moscas *y¹ M[vas-int.Dm]ZH-2A w^{*}; M[3xP3-RFP.attP]ZH-86Fb* (BDSC).

9. Análisis de Ontología Génica

Los análisis de ontología génica se llevaron a cabo mediante el software DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (Huang et al., 2009b), se compararon los listados de genes con un fondo que incluye todos los genes de *Drosophila* y se clasificaron utilizando términos relacionados con procesos biológicos (GOTERM_BP_4). Tomamos como término enriquecido aquél que tiene un p-valor menor de 0,05. Cuando aparecen varios términos enriquecidos redundantes se simplificó la anotación tomando el término que incluyó más genes.

10. Inmunoprecipitación de cromatina

El ensayo de ChIP-on-chip (inmunoprecipitación de cromatina seguida de hibridación en array) se llevó a cabo por la Dr. Fernández Hevia en el laboratorio de Steve Russell (*Cambridge Systems Biology Centre*, Reino Unido), utilizando el protocolo descrito por Sandmann y colaboradores (Sandmann et al., 2006), el cual se modificó para su uso en discos imaginales. Se utilizaron dos réplicas de discos *UAS-salm-CFP-His-Myc/sal^{EPV}-Gal4*.

10.1 Extracción y fijación de la cromatina

Para cada réplica se diseccionaron entre 70 y 80 cabezas de larva de tercer estadio en PBS frío y se fijaron en formaldehído/PBS 2% durante 20 minutos a temperatura ambiente, de esta manera se consiguen fijar la unión entre las proteínas y el ADN de manera reversible. Se hicieron lavados sucesivos con PBS/Glicina 125mM/Tritón X-100 0,01% (2 veces), PBS (1 vez), y un lavado con PBS suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). En esta misma solución se recolectaron 150 discos imaginales de ala que se congelaron en seco en N₂ líquido y almacenados a -80°C. La extracción de cromatina se llevó a cabo incubando las muestras en 20 μ l de solución de lisis (PIPES pH 8 5 mM/KCl 85 mM/Tritón X-100 0,01%) con inhibidores de proteasas. Estas muestras se homogenizaron en hielo de manera mecánica con un émbolo de plástico durante 2 minutos y se centrifugaron a 10000 rpm (4 veces). Seguidamente se añadieron 300 μ l de solución de lisis nuclear (Tris-HCl pH 8,1 50 mM/ EDTA-Na₂ 10mM/SDS 1%) con inhibidores de proteasas y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras 30 segundos a 10000 rpm y se procedió a la sonicación para fragmentar la cromatina. Para este proceso se dividieron las muestras en alícuotas de 100 μ l a las que se dieron 7 ciclos de sonicación (30 segundos encendido/30 segundos apagado) en condiciones de alta energía con el equipo Bioruptor NextGen (Giagenode). Todas las alícuotas sonicadas se

juntaron y se centrifugaron 30 segundos a 10000 rpm, se almacenaron alícuotas de 250 μ l de cromatina sonicada a -80°C. Con una muestra de 50 μ l se valoró la calidad de la cromatina y su grado de fragmentación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, el tamaño medio esperado de los fragmentos es de 500 pb aproximadamente.

10.2 Inmunoprecipitación, aislamiento y amplificación del ADN.

Una vez preparadas las muestras de cromatina se procedió a la inmunoprecipitación, aislamiento del ADN y amplificación. Cada muestra de cromatina congelada se dividió en dos muestras de 125 μ l con las que se llevó a cabo la inmunoprecipitación de cromatina (Sandmann et al., 2006). Para ello primero se incubaron con Proteína A agarosa (Millipore), y luego 125 μ l de una de las muestras se inmunoprecipitó utilizando anticuerpo anti-GFP (*anti-GFP tag antibody-ChIP grade*, Abcam, 1:400) y otros 125 μ l control con el anticuerpo anti- β Gal (*Anti-beta galactosidase*, Abcam, 1:4000). Se reservaron 10 μ l de la muestra sonicada sin inmunoprecipitar (input total). Tras la inmunoprecipitación se purificaron las muestras de ADN y se amplificaron por PCR generando extremos romos en los fragmentos de ADN. Seguidamente se hizo una ligación de los adaptadores en los extremos de dichos fragmentos que servirán para llevar a cabo una amplificación con cebadores específicos (oligonucleótidos 20-mer) (Sandmann et al., 2006). Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% se comprobó que se había producido amplificación.

10.3 Marcaje con fluorocromos, hibridación y escaneado del array.

Tras la amplificación se marcaron los diferentes fragmentos con fluorocromos, utilizando Cy3 para los fragmentos de la precipitación con GFP y Cy5 para la precipitación control (β gal) siguiendo el protocolo de NimbleGen *Dual-Colour Labeling for HD2 arrays* (Roche). Cada muestra marcada con su correspondiente fluorocromo se prepararon juntos para su hibridación en el array, añadiendo oligonucleótidos de anillamiento específicos. La hibridación se hizo sobre arrays HD2 de NimbleGen, que tienen sondas que cubren todo el genoma de *Drosophila melanogaster*. Se aplicó el protocolo *NimbleGen Hybridisation for HD2 arrays* (Roche). Tras la hibridación se hicieron varios lavados con el *NimbleGen Wash kit* y se escanearon con el *NimbleGen Scanner* usando el programa GenePix 4000B, obteniendo los archivos producto del escaneado de cada canal (Cy3 y Cy5).

10.4 Procesamiento bioinformático.

Los archivos producto del escaneado se procesaron con el programa NimbleScan que proporciona valores de intensidad para cada sonda y cada canal. Los datos de las dos réplicas se normalizaron enfrentando los datos experimentales y los control, además se hizo un control de calidad utilizando el programa NibleGene Data QC ejecutado en entorno R, obteniéndose tanto diagramas que determinan la calidad de los datos como un histograma que ilustra el enriquecimiento en la detección de intensidad de sondas en el experimento frente al control. Mediante el programa Ringo se detectaron los picos de enriquecimiento, y de nue-

vo se generan diagramas de calidad así como puntuaciones para cada sonda, que hacen referencia al nivel de enriquecimiento de la intensidad, comparando las situaciones control y experimento, asignándose un p-valor. Se genera un archivo .sgr en el que se representan los picos de enriquecimiento a lo largo de todo el genoma. La puntuación de cada sonda puede valorarse a FDR (*false discovery rate*) 25, 10, 5 y 1. También se genera un archivo .bed con las coordenadas de las regiones que abarcan los picos de enriquecimiento a cada FDR. Para visualizar y poner en contexto genómico estos archivos se utilizó el programa IGB (*Integrated Genomic Browser*).

11. Análisis de marcas epigenéticas.

Para analizar si existen marcas epigenéticas asociadas a regiones específicas del ADN tomamos los datos publicados por el laboratorio de Karpen G. para células de discos mesotorácicos dorsales CME-W1-CI.8⁺ (Celniker et al., 2009). Analizamos mediante Galaxy (Goecks et al., 2010; Blankenberg et al., 2010) el porcentaje de cobertura para cada una de las marcas descritas en dicho trabajo y las comparamos con el porcentaje de cobertura que encontramos en la totalidad del genoma de *Drosophila melanogaster*. Mediante un test de X^2 comprobamos si las diferencias que encontramos son significativas.

12. Inmunoprecipitación de proteínas e inmunodetección tras electroforesis.

Se realizó a partir de embriones recogidos tras una puesta de 24h a los que previamente se les elimina el corion en Lejía 50%. Los embriones se congelaron a -80°C para su almacenamiento, y se homogenizaron mecánicamente mediante un homogenizador de esferas (Restch MM300) en 600 μ l de RIPA (SDS 0'1%, NP40 1%, TrisClH 40 mM pH 7'4, NaCl 120 mM, DOC 0'5%, EDTA 6 mM, EGTA 6 mM, PMSF 100 μ M e inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) durante 2 minutos a una frecuencia de 30 pulsos/s. El homogeneizado se solubiliza durante 4h a 4°C en movimiento, separando el lisado celular mediante centrifugación a 14000 rpm en microfuga durante 20 min. Se determina la cantidad de proteína del lisado mediante el método de Lowry (Bio-Rad *DCTM Protein Assay*) utilizando proteína de suero bovino (BSA) como patrón.

Para el ensayo de inmunoprecipitación tomamos 5 mg de proteína del extracto de embriones e incubamos con 5 μ l de anticuerpo para Salm (realizado en conejo; de Celis et al., 1996) en una solución de RIPA suplementada con 500 ng/ml de BSA y glicerol 10% durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se añaden 12 μ l de Proteína A/G (sc-2003; Santa-Cruz biotechnologies) unida a Sefarosa 50% (InvitrogenTM) y se incuba durante 1h a 4°C en agitación. Los complejos inmunes se recogen por centrifugación en la microfuga (5 min, 3000 rpm) y tras descartar el sobrenadante se lavaron 6 veces con 1 ml de RIPA. Las proteínas inmunoprecipitadas se resuspendieron en 20 μ l de tampón de muestras de electroforesis.

Las muestras (previamente hervidas) se resolvieron mediante análisis en geles de

SDS-poliacrilamida al 6% (Laemmli et al., 1970) junto con patrones de peso moleculares comerciales (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a un filtro de Immobilon PVDF, previamente activado durante 1 min en metanol, mediante transferencia semi-seca (Trans-Blot SD Semi-Dry Bio-Rad) en tampón carbonato (Na_2CO_3 3 mM, NaHCO_3 10 mM, 20% metanol) a 15 V durante 90 min. Las membranas se incuban durante 1h en medio TBS (Tris-HCl 10mM pH 7.5, NaCl 150 mM) suplementado con BSA 5% (TBS-BSA) tras comprobar por tinción con rojo Ponceau la transferencia de proteínas, para bloquear los sitios de unión inespecífica. Tras el bloqueo se incuba durante toda la noche con los anticuerpos específicos (Salm hecho en Rata 1/100 y Sir2 E2P2 (hybridoma bank) 1:200) en TBS+BSA 3% y se lava 3 veces incubando con TBS+Tween20 0,15% (TBS-T) 15 min. Incubamos con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (anti-inmunoglobulina de rata 1/8000 y anti-inmunoglobulina de ratón 1/10000; Santa-Cruz biotechnologies) diluidos en TBS-T. Tras lavar el anticuerpo secundario se procede al revelado mediante un método quimioluminescente en el que la peroxidasa cataliza la oxidación del luminól en presencia de H_2O_2 (ECL, Amersham).

Para la anotación de las coordenadas del genoma de *Drosophila* se ha utilizado la versión BDGP R5/dm3 2006.

RESULTADOS

La ruta de BMP/Dpp regula la expresión de los genes *sal* (de Celis et al., 1996) y éstos median, al menos en parte, las funciones de esta ruta de señalización durante el desarrollo del ala (Organista y de Celis, 2013). Aunque es de esperar que las proteínas Sal regulen la expresión génica actuando como factores de transcripción, no se conoce el mecanismo por el cual actúan ni la identidad de sus genes diana.

1. Búsqueda de genes candidatos a ser regulados por Sal.

Para identificar genes diana de las proteínas Sal llevamos a cabo una búsqueda a nivel genómico mediante el uso de microarrays de expresión.

1.1 Análisis de la expresión génica mediante microarrays en discos de ala silvestre y en discos con expresión reducida de los genes Sal.

Para llevar a cabo el estudio a nivel genómico partimos de la premisa de que la expresión de los genes diana para Sal cambiará en discos *sal* mutantes. De esta forma compararemos los perfiles de expresión génica entre individuos silvestres e individuos con disminución de niveles de las proteínas Sal (condición mutante). Además de contrastar dos condiciones genéticas, analizamos también los cambios de expresión génica a diferentes tiempos desde que se provoca la bajada de la expresión de *sal* en el genotipo mutante. Asumimos que las dianas directas de Sal variarán temprano su expresión en respuesta a la pérdida de Sal. Por el contrario, los genes que cambien más tarde podrían hacerlo de manera indirecta como consecuencia de las modificaciones originadas por la ausencia de Sal.

1.1.1 Establecimiento y análisis de los genotipos a utilizar.

Para realizar este abordaje utilizamos dos estirpes de moscas: *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/UAS-GFP*; *tub-Gal80^{ts}/+* que utilizaremos como control (discos de ala con una expresión normal de Sal; Figura 10A) y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i*; *tub-Gal80^{ts}/UAS-salr-i*

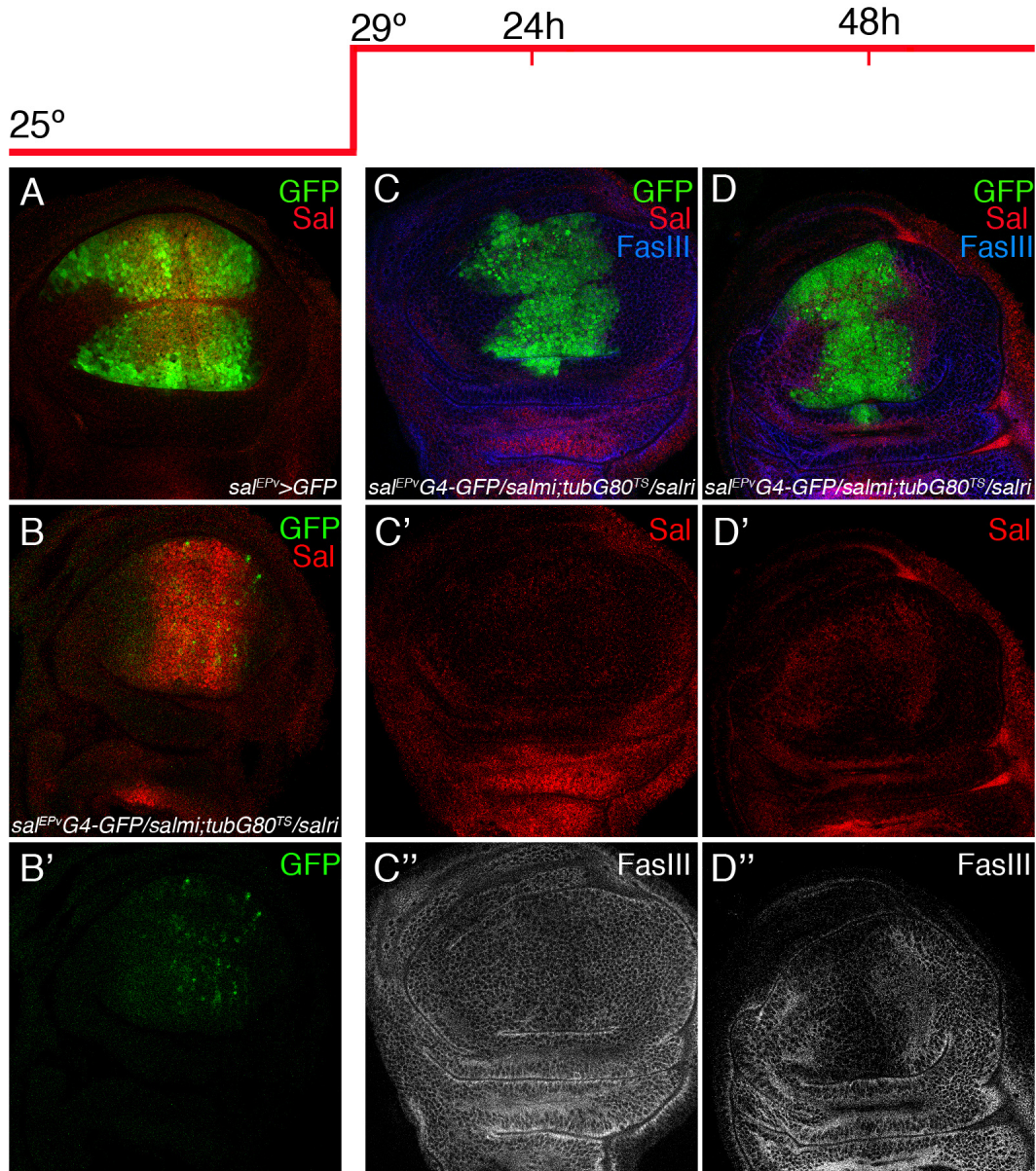


Figura 10. Consecuencias de la reducción transitoria de los niveles de Sal. Discos de ala de tercer estadio mostrando la expresión de GFP (verde), Salm (rojo) y FasIII (azul en C-D, gris en C''-D''). (A) Disco de genotipo *sal^{EPV}-Gal4/UAS-GFP*. (B-D) Discos de genotipo *tubGal80^{TS}/+; sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/UAS-salmi; UAS-salri/+* desarrollados a 25°C (B-B'), o fijados 24h (C-C'') o 48h (D-D'') después de transferir las larvas a 29°C. Mediante el sistema Gal4/Gal80^{TS} se dirige al territorio de expresión *sal* (A, verde) la expresión de GFP y de los ARNi de *salm* y *salr*, pero sólo cuando las larvas se desarrollan a 29°C. Comprobamos que a 25°C Gal80^{TS} es funcional e impide que Gal4 dirija la expresión de GFP (B-B', verde) y los ARNi de *salm* y *salr*, encontrando expresión de Salm (B, rojo). A 29° la proteína Gal80^{TS} no es funcional y Gal4 dirige la expresión de GFP (C y D, verde). 24h desde el cambio de temperatura son suficientes para que Salm deje de detectarse (C-C', rojo) aún conservando el epitelio una morfología silvestre (C'', FasIII). A 48h Sam sigue sin detectarse (D-D', rojo), pero observamos una reducción en el nivel de expresión del marcador epitelial FasIII (D'').

como mutante (discos en los que se dirige la expresión de los ARN de interferencia de *salm* y *salr* en la región donde normalmente se expresan estos genes en la región central de ala). Gracias al sistema Gal4/Gal80^{TS} dispondremos de discos de ala en los que la disminución de Sal se ha dado durante 24h (T24) o durante 48h (T48) antes de su disección (Figura 10).

Observamos que a temperatura permisiva (25°C) no hay expresión de proteína GFP y *sal* se expresa en su patrón normal en la región central del ala (Figura 10B-B'). A temperatura restrictiva (29°C) vemos que 24h son suficientes para apreciar la aparición de GFP así como una reducción de los niveles de Sal (Figura 10C-C'). A esta edad (T24), el epitelio no está modificado (Figura 10C-C''). Tras 48h a 29°C (T48) seguimos apreciando la bajada de Sal y la presencia de GFP (Figura 10D-D'). En este caso, la región central del disco de ala está reducida en tamaño y pierde la expresión de FasIII, un marcador epitelial (Figura 10D-D').

1.1.2 Análisis de la expresión génica: Microarrays

Tras extraer ARNm de cada una de las condiciones anteriormente mencionadas: situación mutante y control a T24 y T48 respectivamente (3 réplicas por experimento; 40 discos imaginales de ala por réplica); se estudiaron los perfiles de expresión génica mediante la hibridación en microarrays con sondas que representan todos los genes de *Drosophila* (experimentos realizados por el empresa Bioarray). Se compararon cada una de las condiciones (T24 o T48) con sus respectivos controles, luego los datos fueron normalizados para poder hacer una comparación de cada uno de los grupos entre sí. Encontramos que entre las situaciones control a 24h y 48h no se observa ningún cambio de expresión, como cabría esperar. Si comparamos los perfiles de expresión de los discos de ala de larvas *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; tub-Gal80^{TS} UAS-salr-i* entre T24 y T48 observamos que cambia la expresión de 72 genes, de los cuales la mayoría (69) experimentan un incremento en su expresión a T48 respecto con T24.

Al comparar los datos obtenidos de discos de la situación mutante a T24 con su control encontramos 686 genes que varían su expresión de manera significativa ($p\text{-valor} \leq 0,05$). De este grupo, 98 presentan un cambio con un *fold-change* (FC) mayor de 2. El número de genes que cambian su expresión a T48 aumenta hasta 1488, y de éstos 168 lo hacen con un $FC > 2$ (Figura 11A). Asumimos que a T48 además de los genes diana de Sal también variarán la expresión otros genes de manera indirecta, explicando el mayor número de cambios observados a este tiempo. De los genes en los que detectamos un cambio a T24 la mayoría (521/686) también presentan cambio a T48 (Figura 11). Para los 165 restantes, que sólo presentan un cambio en T24, observamos que presentan unos valores de FC generalmente más bajos, teniendo sólo 10 de ellos un cambio con una magnitud mayor de 2. Para realizar el análisis de este conjunto de genes decidimos primero seleccionar de entre el total de 686 // 1488 genes, aquellos cuyo cambio de expresión es de al menos dos veces en T24 o T48 ($FC > 2$, que corresponde a $\log FC \geq 1$) obteniendo un grupo de 191 candidatos (Figura 11B). Los datos obtenidos en este experimento se muestran en la Tabla suplementaria 4.

En el laboratorio previamente se había realizado un experimento similar en el que se comparaban los perfiles de expresión génica entre discos de ala mosaicos para una deficiencia de *sal* (*sd-Gal4/+; Df(2L)sal^{FP5} FRT40/FRT40 M(2)z; UAS-FLP/+*) y discos de ala que sobre-expresaban Salm (*756-Gal4/UAS-sal^{4B}*) (Organista, 2012). El 30% de los genes que

hemos seleccionado en nuestro análisis fueron también identificados utilizando estos abordajes experimentales. Para realizar una selección de genes candidatos incorporando los datos de ambos experimentos, añadimos a nuestro grupo de 191 genes un total de 95 que presentaban muy buenos valores estadísticos en los experimentos previos. La colección resultante de genes es a la que llamamos genes candidatos a ser diana de las proteínas Sal (286 genes; Figura 11B). De este conjunto, 139 genes son candidatos a ser reprimidos por Sal (Sal+), y 147 genes son candidatos a ser activados por Sal (Sal-; Figura 11B; Tablas 1 y 2).

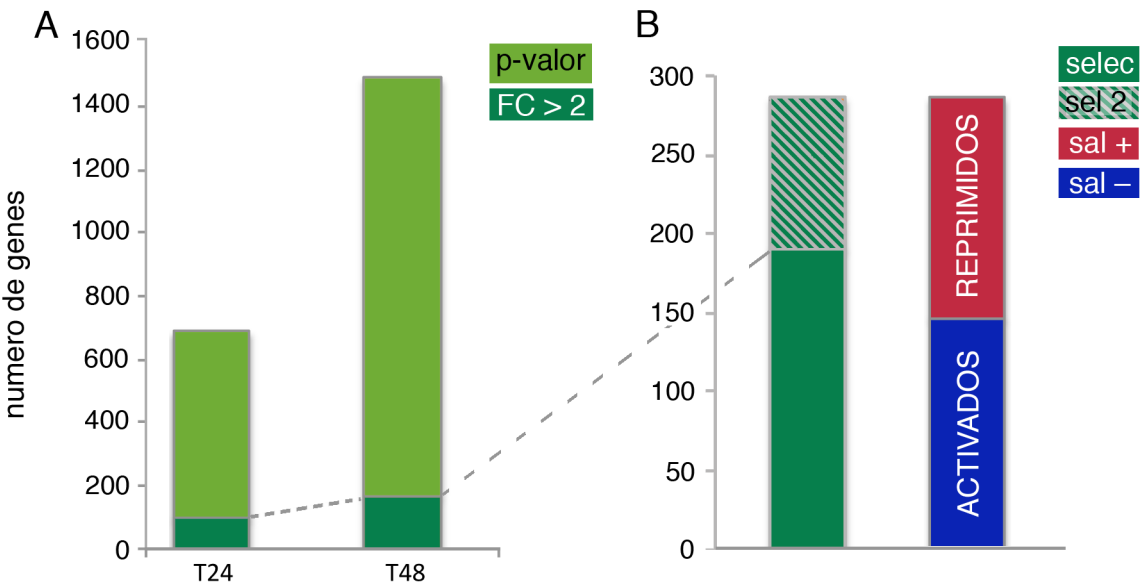


Figura 11. Número de genes seleccionados en el microarray. (A) Número de genes que presentan un cambio significativo (P valor $<0,05$) a T24 (686) y T48 (1488). Se representan en verde oscuro aquéllos en los que la magnitud del cambio es mayor de 2 (191). (B) Genes seleccionados (191; selec en verde) y genes añadidos a partir de experimentos de microarray previos (Organista, 2012) (95; sel 2 en columna rayada). Los genes seleccionados incluyen 139 que son reprimidos (sal+; rojo) y 147 activados (sal-; azul) por Sal.

spalt –

Gen	Símbolo	logFC 24h	logFC 48h	<i>in situ</i>	Fenotipo
CG10344	CG10344	-1,12	1,10	U=	+
CG10539	S6k	-0,70	1,03	U=	wS
CG10541	Tektin-C	-5,10	4,93	U=	EPL//S-P
CG10576	CG10576	-1,22	1,16	P-	+
CG11253	CG11253	-1,11	1,05	U=	+
CG11263	CG11263	-1,03	0,85	U-	+
CG12182	CG12182	-0,96	1,07	U-	S-V//S-P
CG12275	RpS10a	-0,43	1,08	U=	EPL//sS-P
CG12843	Tsp42Ei	-0,87	1,27	P-	sF//+
CG13083	CG13083	-1,31	1,54	U-	PL/nW//wS-P
CG1342	Spn100A	-1,44	1,46	P-	+
CG13890	CG13890	-1,28	1,07	U-	Cell Pig./+
CG13897	CG13897	-1,17	1,05	U-	+
CG14394	NijC	-2,34	2,63	U-	Bs/S/V+
CG14485	swi2	-1,05	0,65	U-	+
CG14715	CG14715	-1,84	1,67	U=	+
CG15236	CG15236	-1,74	1,33	U=	S/Bs
CG15707	krimp	-1,79	1,50	U=	+
CG17077	pnt	-1,26	1,18	U=	+
CG2161	Rga	-1,19	1,07	U=	S // S/CD
CG2849	Rala	-3,04	2,99	U=	S-P/nW//S-P
CG30104	CG30104	-1,54	1,04	U-	sF//+
CG30488	CG30488	-1,47	1,37	U=	wV+/wBs
CG31262	CG31262	-1,12	1,05	U=	+
CG31436	CG31436	-2,99	2,60	U-	S/V-
CG31809	CG31809	-1,76	1,57	N=	+
CG31810	CG31810	-1,54	1,31	N=	+
CG32364	CG32364	-2,31	1,81	U-	+
CG33140	CG33140	-1,43	1,61	U=	EPL//S-P
CG33302	Cpr31A	-1,46	1,14	U-	S/Bs
CG34215	CG34215	-2,83	2,87	U=	-----
CG3649	CG3649	-1,61	1,50	P=	sS-P//S-P
CG40178	CG40178	-1,14	1,17	U=	sF//+
CG4086	Su(P)	-1,58	1,74	U=	+
CG41320	CG41320	-1,28	1,35	U-	sF//+
CG42330	Dscam4	-3,66	3,84	U-	+
CG43079	nrm	-1,13	1,34	P=	+
CG43103	CG43103	-1,84	2,02	U=	-----
CG43117	CG43117	-1,19	1,34	U-	+
CG4570	CG4570	-2,15	1,82	U-	sS
CG5671	Pten	-4,00	4,00	U=	LS
CG6013	CG6013	-1,18	1,04	P-	+
CG7160	Cpr78E	-1,47	1,88	U-	sS
CG7354	mRpS26	-1,04	0,69	U=	EPL//S-P
CG7478	Act79B	-1,26	1,29	U-	+
CG7532	l(2)34Fc	-1,63	0,94	U-	+
CG7607	CG7607	-1,61	1,54	U=	+
CG7916	CG7916	-0,83	1,06	U=	sF//+
CG8023	eIF4E-3	-1,35	1,39	U-	+
CG8768	CG8768	-0,98	1,07	U-	sS
CG9333	Oseg5	-2,34	2,42	U-	S/V+
CG13053	CG13053	-1,07	-----	U-	+
CG17134	CG17134	-1,10	-----	U-	+
CG2360	Ccp84Aa	-1,02	-----	U=	+
CG3200	Reg-2	-0,99	-----	U-	+

spalt –

Gen	Símbolo	logFC 24h	logFC 48h	<i>in situ</i>	Fenotipo
CG32444	CG32444	-1,12	-----	U-	+
CG43114	CG43114	-0,95	-----	U-	-----
CG6579	<i>atilla</i>	-0,92	-----	N=	sF//+
CG8800	CG8800	-1,01	-----	U=	sF//+
CG11051	<i>Nplp2</i>	-----	1,31	-----	+
CG14332	CG14332	-----	2,07	-----	+
CG17876	<i>Amy-d</i>	-----	1,26	-----	+
CG18363	<i>dic-04</i>	-----	1,19	-----	+
CG33126	<i>NLaz</i>	-----	1,27	-----	sS/V+
CG42798	CG42798	-----	1,91	-----	-----
CG42834	CG42834	-----	2,27	-----	-----
CG9486	CG9486	-----	1,50	-----	S/Bs
CG	Símbolo	selección		<i>in situ</i>	Fenotipo
CG10041	CG10041	UAS	-----	U-	+
CG10225	<i>RanBP3</i>	Df	-----	U-	F//+
CG10382	<i>wrapper</i>	UAS	-----	U-	+
CG11212	<i>Ptr</i>	UAS	-----	U-	+
CG11357	CG11357	Df	-----	U-	L/Bs
CG11607	<i>H2.0</i>	UAS	-----	U-	L//sS-P
CG11797	<i>Obp56a</i>	UAS	-----	U-	+
CG11883	CG11883	UAS	-----	U-	S-P//S-P
CG12052	<i>lola</i>	UAS	-----	U-	L/F
CG12256	CG12256	UAS	-----	U-	+
CG12287	<i>pdm2</i>	UAS	-----	U-	Bs
CG1273	CG1273	UAS	-----	P-	+
CG12952	<i>sage</i>	Df	-----	U-	+
CG13618	CG13618	UAS	-----	U-	+
CG13848	<i>pinta</i>	Df//UAS	-----	U-	+
CG14590	CG14590	UAS	-----	U-	+
CG14869	CG6107	Df	-----	U-	+
CG15369	CG15369	Df	-----	U-	+
CG15739	CG15739	Df	-----	U-	F//S-P
CG16705	<i>SPE</i>	Df	-----	U-	L//S-P
CG16712	CG16712	Df	-----	U-	+
CG16756	CG16756	Df	-----	U-	S
CG16947	CG16947	Df//UAS	-----	U-	+
CG1725	<i>dlg1</i>	Df	-----	U-	L//sS-P
CG1763	<i>nod</i>	UAS	-----	U-	+
CG1780	<i>ldgf4</i>	Df//UAS	-----	U-	+
CG18024	<i>SoxN</i>	Df	-----	U-	+
CG18255	<i>Strn-Mlck</i>	Df	-----	U-	-----
CG18410	<i>Ude</i>	UAS	-----	U-	+
CG18657	<i>NetA</i>	UAS	-----	P-	+
CG1869	<i>Cht7</i>	Df	-----	P-	sS-P//sS-P
CG2056	<i>spirit</i>	Df	-----	U-	+
CG2488	<i>phr6-4</i>	Df	-----	U-	+
CG2706	<i>fs(1)Yb</i>	Df//UAS	-----	U-	+
CG30069	CG30069	Df	-----	P-	S/Bs
CG3097	CG3097	UAS	-----	U-	-----
CG3100	<i>b6</i>	UAS	-----	U-	+
CG31098	CG10634	Df//UAS	-----	U-	V+
CG31721	<i>Trim9</i>	UAS	-----	P-	+
CG31764	<i>vir-1</i>	Df//UAS	-----	P-	+
CG31839	<i>nimB2</i>	Df	-----	U-	+
CG31884	<i>Trx-2</i>	UAS	-----	U-	+

spalt –

Gen	Símbolo	logFC 24h	logFC 48h	<i>in situ</i>	Fenotipo
CG32029	<i>Cpr66D</i>	Df//UAS	-----	U-	S/Bs
CG32055	CG32055	Df//UAS	-----	P-	wS
CG32261	<i>Gr64a</i>	UAS	-----	U-	S/F
CG3240	<i>Rad1</i>	Df	-----	U-	+
CG32491	<i>mod(mdg4)</i>	Df	-----	U-	F
CG3289	<i>Ptpa</i>	Df	-----	U-	+
CG33197	<i>mbl</i>	Df//UAS	-----	U-	Bs/P
CG33960	<i>Sema-2b</i>	UAS	-----	U-	+
CG33970	CG33970	UAS	-----	P-	+
CG34406	CG44002	UAS	-----	U-	+
CG42614	<i>scrib</i>	UAS	-----	U-	PL/nW/sS-P/CD
CG4322	<i>moody</i>	UAS	-----	U-	S-P//S-P
CG4379	<i>Pka-C1</i>	UAS	-----	U-	S-P
CG4398	CG4398	UAS	-----	U-	+
CG4432	<i>PGRP-LC</i>	Df	-----	U-	+
CG4565	CG4565	UAS	-----	U-	+
CG5249	<i>Blimp-1</i>	UAS	-----	U-	S-P/F
CG6134	<i>spz</i>	Df	-----	U-	+
CG6713	<i>Nos</i>	Df	-----	U-	+
CG7201	CG7201	UAS	-----	P-	sF//+
CG7420	CG7420	Df	-----	U-	L
CG7577	<i>ppk20</i>	Df//UAS	-----	U-	S
CG7734	<i>shn</i>	UAS	-----	U-	sS-P//sS-P
CG7897	<i>gp210</i>	Df	-----	U-	-----
CG7906	CG7906	Df	-----	U-	+
CG8084	<i>ana</i>	UAS	-----	P-	S/V+//S-P
CG8589	<i>tej</i>	UAS	-----	U-	+
CG8675	CG8675	Df	-----	U-	S-P/nW//S-P
CG8773	CG8773	UAS	-----	U-	+
CG8780	<i>tey</i>	UAS	-----	U-	Bs/S
CG8945	CG8945	Df	-----	U-	F
CG9355	<i>dy</i>	UAS	-----	U-	L//S-P
CG9460	<i>Spn42De</i>	Df	-----	U-	+
CG9850	CG11169	Df//UAS	-----	P-	sF//+

Tabla 1. Genes clasificados como Sal-. Genes candidatos a ser activados seleccionados por un cambio significativo en su expresión y una magnitud del cambio de al menos 2X. Se indican los datos de FC a T24 y T48 (logFC 24h y 48h, respectivamente). (*In situ*) Datos obtenidos del análisis de hibridación *in situ* siendo U, expresión generalizada; P, restringida y N, sin expresión en fondo silvestre y su cambio en fondo mutante siendo =, sin cambio y –, cuando disminuye la expresión. (Fenotipo) Fenotipo de las alas de las combinaciones *UASdicer*; *nubG4 RNAi* y *UASdicer*; *sal^{EPV}G4 RNAi* (*nubG4*//*sal^{EPV}G4*) siendo: +, silvestre; S, tamaño reducido; F, ala arrugada; S-P, defectos en tamaño y formación del patrón; V, defectos en las venas (V+, formación ectópica, V-, falta parcial); LS (aumento de tamaño); Bs, aparición de ampollas; nW, ausencia de ala; Cell. Pig, un aumento en la pigmentación celular y L, letalidad (PL, letalidad pupal y EPL, para pupa temprana) se añadió “s” o “w” delante para indicar si es una modificación más fuerte o débil respectivamente.

spalt +						
CG	Símbolo	logFC 24h	logFC 48h	in situ	JNK	Fenotipo
CG1058	<i>rpk</i>	0,99	-1,20	P-	-----	+
CG10965	<i>Corp</i>	0,43	-1,04	U+	-	wS
CG11086	<i>Gadd45</i>	1,63	-2,06	U+	-	+
CG11155	<i>CG11155</i>	0,71	-1,01	N=	-----	+
CG11584	<i>CG11584</i>	2,18	-2,84	U-	-	-----
CG11897	<i>CG11897</i>	0,95	-1,22	U+	-	+
CG12177	<i>CG12177</i>	0,72	-1,09	U=	-----	+
CG1221	<i>miple</i>	1,04	-1,26	U-	-----	+
CG12224	<i>CG12224</i>	1,73	-2,18	U=	-----	+
CG12367	<i>Hen1</i>	1,07	-1,45	U=	-----	+
CG13041	<i>CG13041</i>	0,57	-1,10	U=	-----	S-P//S-P
CG13679	<i>CG13679</i>	1,08	-1,08	U-	-----	V+/S
CG13937	<i>CG13937</i>	1,28	-1,44	U-	-----	+
CG14907	<i>CG14907</i>	0,52	-1,22	N+	-	+
CG1512	<i>Cul-2</i>	0,44	-1,53	U+	+	sS
CG15400	<i>CG15400</i>	0,98	-1,04	U-	-----	+
CG15784	<i>CG15784</i>	3,31	-3,98	P+	-	nW/sN//S-P
CG15892	<i>CG15892</i>	1,80	-1,91	U=	-----	+
CG16857	<i>CG16857</i>	1,09	-1,17	U=	-----	+
CG17104	<i>CG17104</i>	0,47	-1,09	P+	-	+
CG17530	<i>GstE6</i>	1,37	-3,53	N+	-	+
CG17533	<i>GstE8</i>	1,47	-2,03	U+	-	PL-nW//S
CG17574	<i>CG17574</i>	0,55	-1,09	U=	-----	+
CG17803	<i>CG17803</i>	1,19	-1,34	N=	-----	+
CG18188	<i>Damm</i>	1,56	-1,89	U=	-----	sF//+
CG18278	<i>CG18278</i>	1,00	-0,99	U=	-----	+
CG18455	<i>Optix</i>	1,20	-1,17	P+	-	S-P
CG1851	<i>Ady43A</i>	0,97	-1,14	U+	+	+
CG18522	<i>CG18522</i>	1,46	-3,82	N+	-	+
CG18543	<i>mtrm</i>	0,67	-1,03	U=	-----	+
CG2184	<i>Mlc2</i>	1,12	-0,93	N=	-----	EPL//S-P
CG2560	<i>Cpr11A</i>	0,56	-1,05	U=	-----	V+
CG2909	<i>CG2909</i>	0,57	-1,27	U+	-	V+
CG2914	<i>Ets21C</i>	0,41	-1,12	U-	-----	+
CG3074	<i>Swim</i>	0,79	-1,91	U+	-	+
CG3081	<i>CG3081</i>	1,67	-2,55	U=	-----	sF//+
CG31332	<i>Unc-115b</i>	1,42	-1,52	U=	-----	+
CG31875	<i>CG31875</i>	0,75	-1,09	U=	-----	+
CG32475	<i>mthl8</i>	1,57	-1,65	U=	-----	+
CG32581	<i>CG32581</i>	1,25	-1,22	U=	-----	EPL//S-P
CG32625	<i>CG32625</i>	0,75	-3,04	U+	-	+
CG32788	<i>Crg-1</i>	0,74	-1,89	U=	-----	+
CG33048	<i>Mocs1</i>	0,70	-1,02	U+	-	-----
CG33653	<i>Caps</i>	1,13	-1,77	U=	-----	+
CG3397	<i>CG3397</i>	1,48	-2,20	U=	-----	+
CG34002	<i>CG34002</i>	1,04	-2,30	U-	-----	-----
CG3448	<i>CG3448</i>	0,66	-1,41	U+	-	+
CG3568	<i>CG3568</i>	1,10	-0,62	U=	-----	+
CG40300	<i>ago-03</i>	0,92	-1,21	N=	-----	+
CG40452	<i>Snap25</i>	0,61	-1,42	N=	-----	+
CG4174	<i>CG4174</i>	0,91	-1,55	U=	-----	+
CG42516	<i>CG42516</i>	0,97	-1,01	U-	-----	-----
CG42644	<i>CG42644</i>	3,23	-3,71	N=	-----	-----
CG43144	<i>CG43144</i>	1,84	-3,26	N+	-	-----
CG43646	<i>CG43646</i>	1,22	-1,50	U=	-----	-----

spalt +						
CG	Símbolo	logFC 24h	logFC 48h	in situ	JNK	Fenotipo
CG43676	CG43676	1,31	-1,55	N=	-----	-----
CG4594	CG4594	2,96	-3,06	U-	-	+
CG4920	ea	1,07	-1,01	U=	-----	+
CG5022	CG5022	1,32	-1,25	U=	-----	+
CG5096	CG5096	2,19	-2,26	U+	-	+
CG5229	chm	1,75	-2,12	U-	-----	wS
CG5966	CG5966	0,66	-1,19	P=	-----	+
CG6658	Ugt86Di	1,21	-1,53	P+	-	+
CG6665	CG6665	1,23	-1,40	U=	-----	+
CG6794	Dif	1,12	-1,96	U+	+	+
CG6912	CG6912	1,76	-1,87	U=	-----	+
CG7035	Cbp80	1,13	-1,17	U=	-----	+
CG7590	scyl	1,22	-0,95	U+	-	+
CG7787	CG7787	0,86	-1,05	U=	-----	+
CG8573	su(Hw)	1,03	-1,02	U=	-----	+
CG8620	CG8620	0,92	-3,54	U-	-----	+
CG8799	l(2)03659	0,99	-1,56	U=	-----	+
CG9214	Tob	1,16	-1,81	U=	-----	+
CG11486	CG11486	0,90	-----	U=	-----	+
CG13316	Mnt	0,90	-----	U-	-----	EPL/nW//+
CG30059	CG30059	1,01	-----	U=	-----	+
CG32019	bt	1,18	-----	N=	-----	+
CG45050	CG43674	0,95	-----	U+	-	+
CG6544	fau	1,27	-----	U=	-----	+
CG7178	wupA	1,31	-----	N=	-----	EPL
CG8663	nrv3	1,26	-----	N=	-----	L
CG10160	ImpL3	-----	-1,18	-----	-----	S-P//S-P
CG10245	Cyp6a20	-----	-1,90	-----	-----	+
CG1155	Osi14	-----	-1,44	P=	-----	+
CG11592	Amnionless	-----	-1,10	-----	-----	+
CG12242	GstD5	-----	-4,15	-----	-----	+
CG12505	Arc1	-----	-3,91	N+	+	S/V
CG12846	Tsp42Ed	-----	-1,95	-----	-----	+
CG12908	Ndg	-----	-1,26	-----	-----	+
CG1299	CG1299	-----	-1,07	-----	-----	EPL//wV+
CG13060	CG13060	-----	-1,25	-----	-----	+
CG13941	Arc2	-----	-1,55	-----	-----	S/Bs
CG14059	llp8	-----	-4,55	-----	-----	+
CG14196	CG14196	-----	-1,30	-----	-----	-----
CG14304	CG14304	-----	-1,09	-----	-----	+
CG14545	CG14545	-----	-1,85	-----	-----	+
CG14695	CG14695	-----	-1,46	-----	-----	+
CG15209	CG15209	-----	-1,08	-----	-----	+
CG15347	CG15347	-----	-2,15	-----	-----	+
CG15623	c-cup	-----	-1,25	-----	-----	+
CG18859	Or19a	-----	-2,14	-----	-----	+
CG2065	CG2065	-----	-1,35	-----	-----	+
CG2885	RabX2	-----	-2,13	-----	-----	+
CG30196	CG30196	-----	-1,73	N+	+	+
CG31062	side	-----	-1,19	-----	-----	+
CG31279	CG31279	-----	-2,50	-----	-----	V+
CG32825	Or19b	-----	-1,76	-----	-----	sF//+
CG34031	CG34031	-----	-1,08	-----	-----	-----
CG34165	CG34165	-----	-1,23	-----	-----	sF//+
CG3767	Jhl-26	-----	-2,23	-----	-----	+

spalt +						
CG	Símbolo	logFC 24h	logFC 48h	in situ	JNK	Fenotipo
CG4181	GstD2	-----	-2,46	-----	-----	sF//+
CG42255	CG42255	-----	-1,50	-----	-----	F/sS
CG42352	Ir40a	-----	-2,02	-----	-----	+
CG42363	CG42363	-----	-1,25	-----	-----	-----
CG4373	Cyp6d2	-----	-1,81	U	-----	+
CG4423	GstD6	-----	-1,85	-----	-----	F/S//Bs
CG5955	CG5955	-----	-2,70	-----	-----	sS/F
CG6042	Cyp12a4	-----	-1,17	-----	-----	+
CG6142	CG6142	-----	-1,14	-----	-----	+
CG7080	CG7080	-----	-1,16	P-	-----	+
CG7356	Tg	-----	-1,27	-----	-----	Bs/S
CG8927	CG8927	-----	-2,11	-----	-----	+
CG9521	CG9521	-----	-1,01	-----	-----	+
CG9877	CG9877	-----	-1,33	-----	-----	-----
CG	Símbolo	Selección		in situ	JNK	Fenotipo
CG10102	CR10102	UAS	-----	N+	+	-----
CG10916	CG10916	Df//UAS	-----	U+	-	PL/nW//wS-P
CG1303	agt	Df//UAS	-----	U+	-	+
CG14121	ver	Df//UAS	-----	U+	-	+
CG15009	ImpL2	UAS	-----	P+	+	+
CG16928	mre11	Df//UAS	-----	N+	-	+
CG18213	CG18213	Df//UAS	-----	N+	-	+
CG1925	mus205	Df	-----	U+	-	sS/Bs//S
CG2999	unc-13	Df//UAS	-----	P+	-	+
CG3008	CG3008	UAS	-----	U+	-	S-P
CG31705	CG31705	UAS	-----	U+	+	+
CG32021	CG32021	Df//UAS	-----	N+	-	V-/S
CG5202	escl	UAS	-----	U+	-	+
CG5247	Irpb	UAS	-----	U+	-	sS//S-P
CG6272	CG6272	Df//UAS	-----	N+	-	EPL

Tabla 2. Genes clasificados como Sal+. Genes candidatos a ser reprimidos seleccionados por un cambio significativo en su expresión y una magnitud del cambio de al menos 2X. Se indican los datos de FC a T24 y T48 (logFC 24h y 48h, respectivamente). (*In situ*) Datos obtenidos del análisis de hibridación *in situ* siendo U expresión generalizada; P, restringida y N, sin expresión en fondo silvestre y su cambio en fondo mutante siendo = cuando no hay cambio; – cuando disminuye y + cuando aumenta. (JNK) comprobación de que el aumento de expresión observado es mediado por la ruta JNK (+) o no (-). (Fenotipo) Fenotipo de las alas de las combinaciones *UASdicer*; *nubG4 RNAi* y *UASdicer*; *sal^{EPV}G4 RNAi* (*nubG4/sal^{EPV}G4*), para la leyenda, consultar el pie de la Tabla 1.

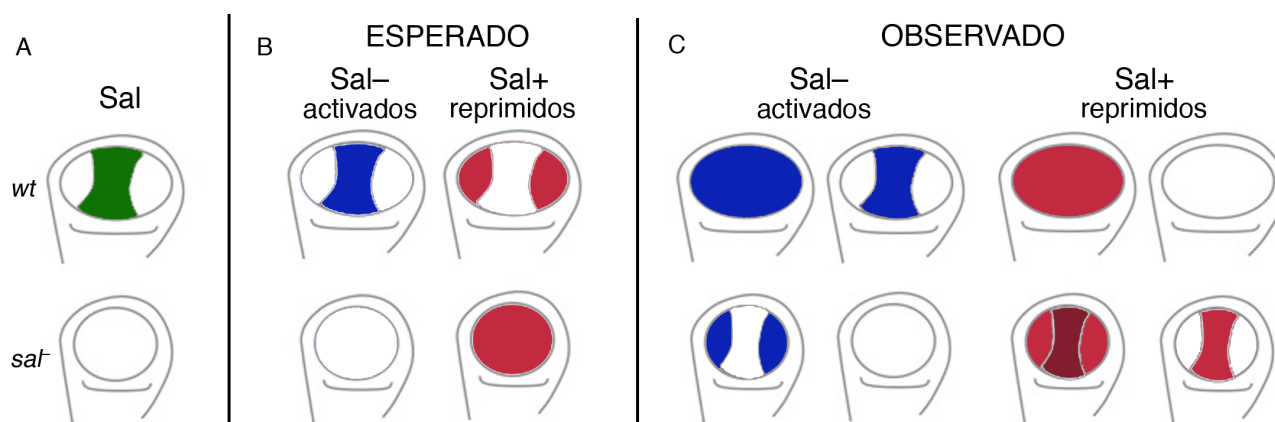


Figura 12. Esquema de los resultados de expresión esperada y observada para genes regulados por Sal. (A-C) Representación esquemática de discos de ala de genotipo silvestre (fila superior) y en condición de reducción de la expresión de *sal* (fila inferior), mostrando la expresión de Sal (verde en A) o la expresión esperada (B) u observada (C) de genes activados por Sal (azul) y reprimidos por Sal (rojo).

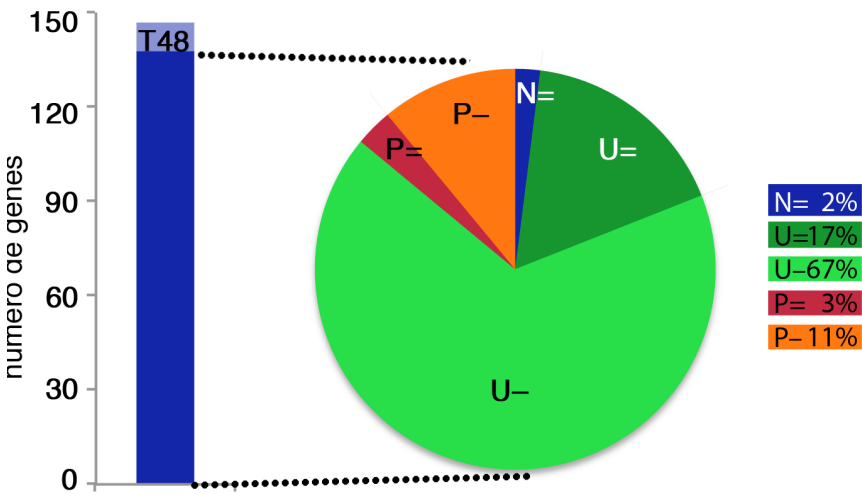
1.2 Análisis de expresión de los genes candidatos a ser regulados por Sal.

Una vez contamos con un conjunto de genes candidatos a ser regulados por Sal, nos preguntamos de qué manera se expresan en el disco imaginal de ala y cómo varían su expresión en la condición de falta de Sal. Esperamos que su patrón de expresión y el de Sal guarden alguna relación, así como que su cambio esté relacionado con los datos de expresión encontrados en el microarray (Figura 12B). Analizamos mediante técnicas de hibridación de ARNm *in situ* la expresión de cada uno de los genes candidatos a ser regulados por Sal en discos de ala silvestres y en discos de ala con expresión de *sal* reducida en la región central del ala (*UAS dicer; sal^{EPv} Gal4/UAS salm-i; UAS salr-i/+*). Los datos de expresión de los 95 genes añadidos a partir del trabajo de Organista 2012 se trataron en conjunto con los de los nuevos candidatos.

1.2.1 Estudio de la expresión de los genes activados por Sal.

De los 147 genes que hemos seleccionado como candidatos a ser activados por Sal (Sal-) descartamos aquellos que se seleccionaron por cambiar su expresión sólo a T48, entendiendo que este cambio puede haberse producido de manera indirecta. De esta manera analizamos 139 genes, observando que la mayoría se expresa de manera generalizada (84%; Figura 13; Figura 14D-F), aunque un número significativo (14%) se expresan en un patrón restringido que en general está relacionado con la formación de los territorios de vena/intervena (Figura 13 y Figura 14A-C). En el 2% restante no se pudo observar ningún tipo de expresión (Figuras 13 y 15D). Los resultados de expresión *in situ* en el fondo mutante *salm-i/salr-i* concuerdan con los datos del microarray, ya que en los casos en los que se detecta un cambio con respecto al silvestre observamos una reducción de expresión en la región central del ala al disminuir los niveles de Sal. Estos cambios los encontramos tanto en genes

Figura 13. Distribución de los patrones de expresión observados en los genes *Sal*⁻. Número de genes activados por *Sal* que fueron descartados para el análisis de expresión por hibridación *in situ* (barra azul clara) y seleccionados (barra azul oscura). Distribución de la proporción de genes (diagrama circular) según la expresión en discos de ala de genotipo silvestre (N, sin expresión; U, generalizada y P, con patrón específico) y según su cambio de expresión en fondo mutante *salmi/salri*: sin cambio (=) o disminución (-).



con una expresión generalizada como en genes que presentan una expresión en zonas restringidas del disco imaginal (Figura 14). En un 22% de los casos no somos capaces de detectar ningún cambio de expresión entre las dos condiciones analizadas (Figura 15). Todos los datos de expresión de los genes *Sal*⁻ se presentan en las figuras suplementarias 1-4.

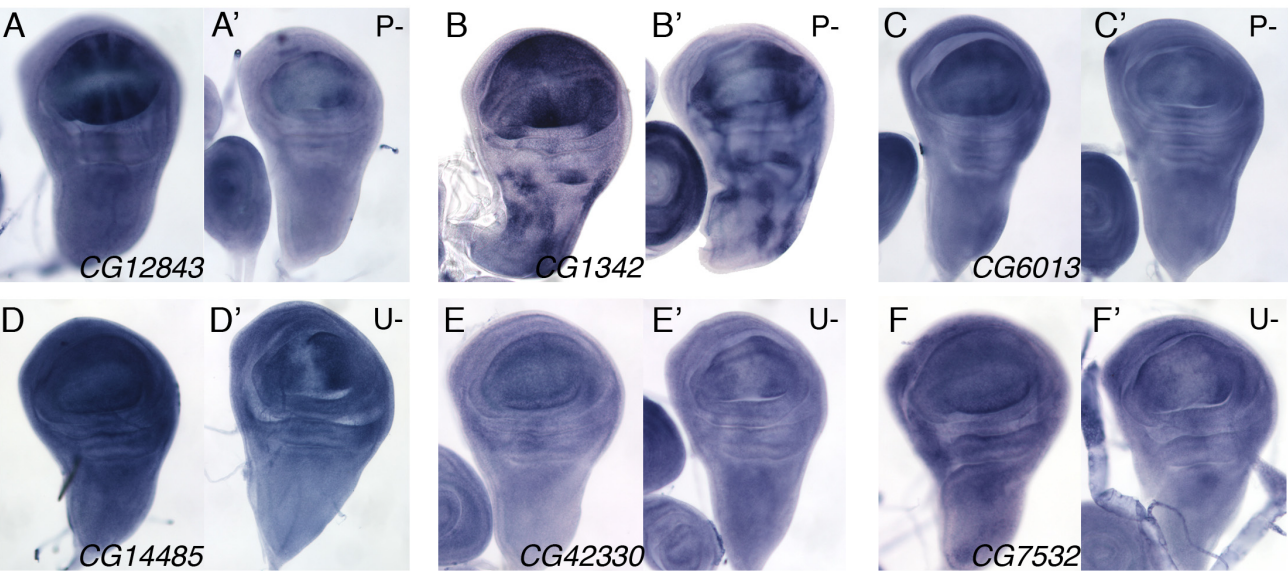


Figura 14. Ejemplos de hibridaciones *in situ* de genes *Sal*⁻ que presentan cambios. (A-F') Hibridación *in situ* en discos de ala de larvas de tercer estadio de genotipo silvestre (A-F), y *UAS dicer; sal^{EPv} Gal4/UAS salm-i; UAS salr-i/+* (A'-F'). Para cada par se muestra en la parte inferior el gen contra el que se ha realizado la sonda AS, y en la esquina superior derecha a qué categoría pertenece según el tipo de expresión y si presenta cambio. En todos los casos se observa una disminución de la expresión del gen en condiciones *salmi/salri* con respecto a los controles silvestres.

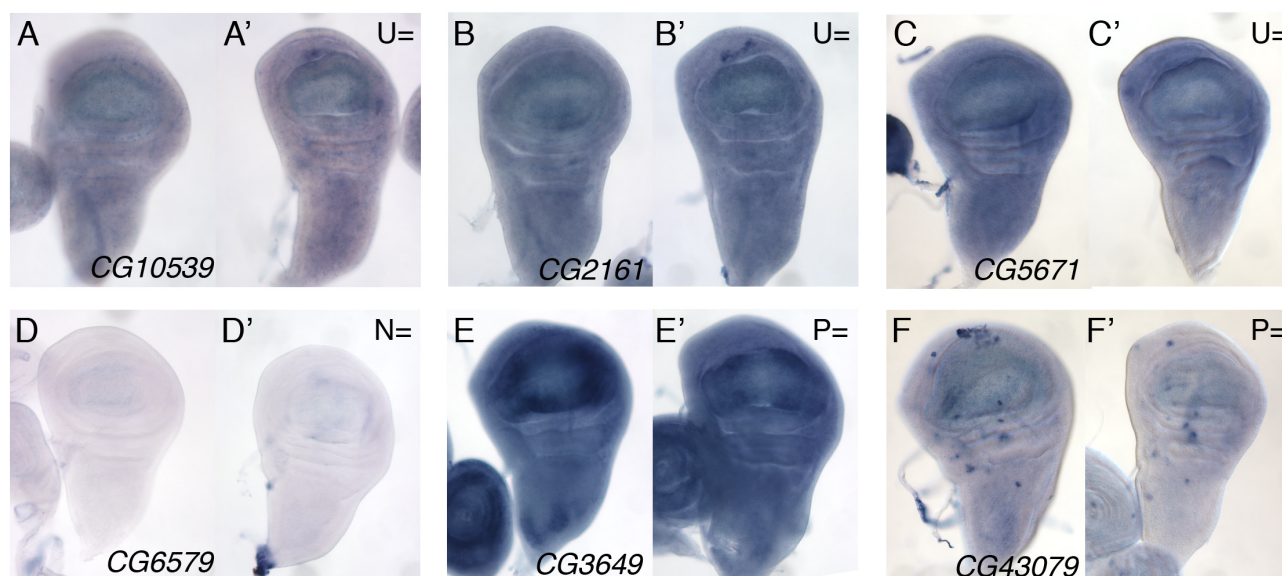


Figura 15. Ejemplos de hibridaciones *in situ* de genes Sal- que no presentan cambios. (A-F') Hibridación *in situ* en discos de ala de larvas de tercer estadio de genotipo silvestre (A-F) y *UAS dicer; sal^{EPV} Gal4/UAS salm-i; UAS salr-i/+* (A'-F'). Para cada caso se muestra en la parte inferior el gen contra el que se ha realizado la sonda AS y a qué categoría pertenece según la expresión y el cambio (esquina superior derecha). No visualizamos una bajada de expresión que corresponda a los cambios encontrados en los experimentos de microarray.

Hemos encontrado dos genes (*CG32372* y *CG17278*) cuya expresión en discos silvestres está restringida al dominio central del ala (Figura 16D-E). En estos casos, no encontramos que la falta de *sal* afecte a esta expresión (Figura 16D'-E'), lo que nos sugiere un modo de regulación dependiente de la ruta de señalización de Dpp. Para estudiar esta posible relación, analizamos la expresión de *CG32372* y *CG17278* en un fondo *UAS-dad* (*sal^{EPV}>dad*), en el que la señalización de Dpp se encuentra bloqueada (Figura 16B-B'). En esta condición encontramos que la expresión de ambos genes disminuye en la región central del ala (Figura 16D''-E''). La regulación de *CG32372* y *CG17278* por Dpp es independiente de los efectos de Dad sobre Sal, ya que la presencia de Sal no rescata la expresión de *CG32372* y *CG17278* en discos con una señalización de la ruta Dpp reducida (*sal^{EPV}>dad; salm*) (Figura 16D'''-E''').

1.2.2 Estudio de la expresión de los genes reprimidos por Sal.

De los 139 genes Sal+ decidimos analizar aquellos que cambian a T24 o que su cambio comienza en T24 y luego continúa en T48. De esta manera descartamos 39 genes que sólo sufren un incremento a T48 (Figura 17). Al igual que ocurre con los genes candidatos a ser activados, la mayoría de ellos se expresan en un patrón generalizado (69%; Figura 17 y Figura 18D-F). En un 21% de los casos no detectamos expresión (Figuras 17 y Figura 18A-C). Tan sólo un 10% de los genes estudiados tienen una expresión restringida que, en general, no está relacionada con el patrón de expresión de las proteínas Sal en el disco imaginal de ala (Figura 17 y Figura 18G-I). En el conjunto de 100 genes Sal+ encontramos

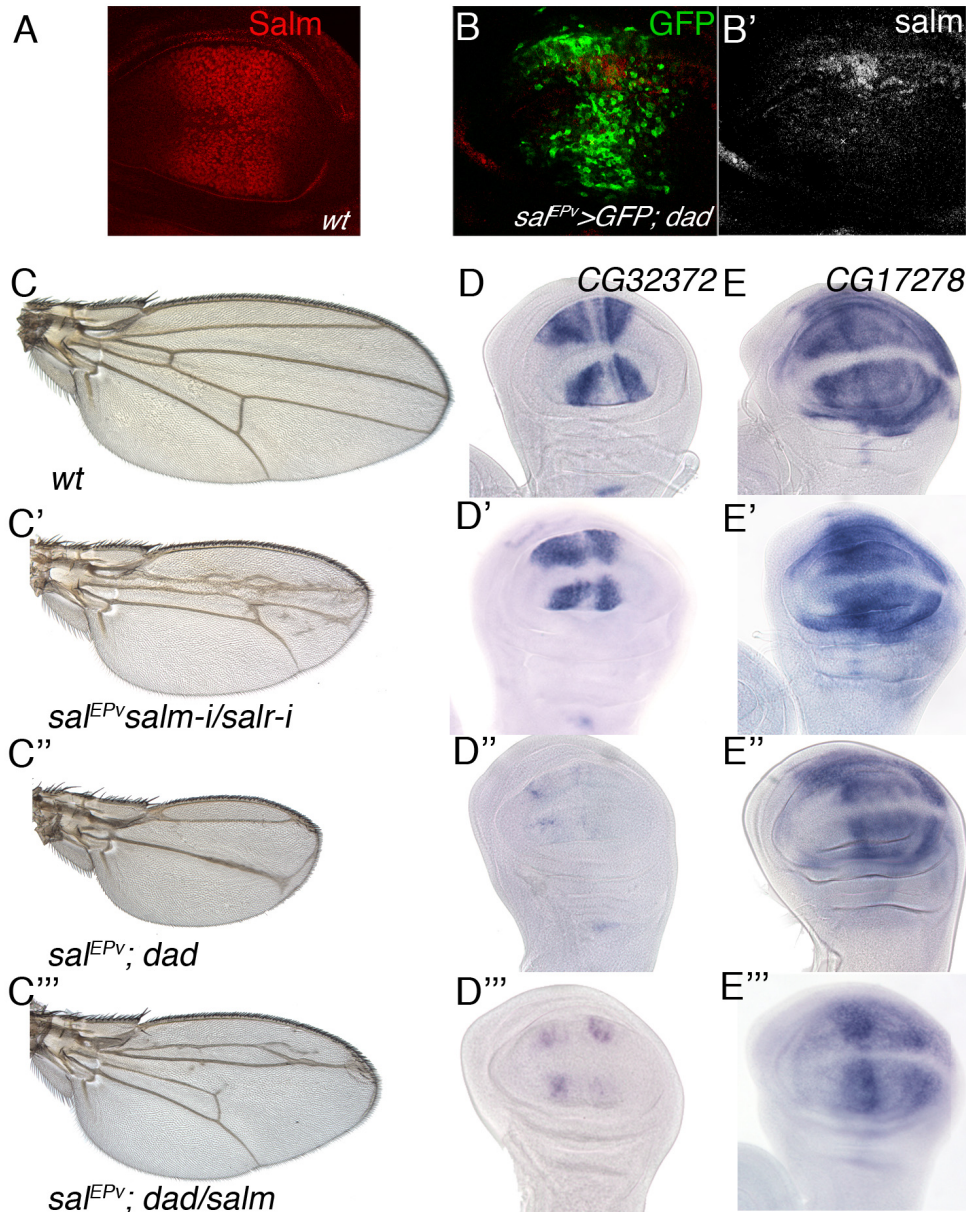


Figura 16. Genes regulados por la ruta Dpp independientemente de Sal. (A-B) Expresión de Salm (rojo en A y B, gris en B') en discos de ala de tercer estadio larvario silvestres (A) y con genotipo *sal^{EPV}-Gal4/UAS-dad* (B-B'). La sobre-expresión de Dad causa una drástica disminución en la expresión de Sal. (C-E'') Alas (C-C'') y discos imaginales de ala de tercer estadio de genotipo silvestre (wt; C-E), *sal^{EPV}-Gal4/UAS-salmi; UAS-salmi/+* (C'-E'), *sal^{EPV}-Gal4/UAS-dad* (C''-E'') y *sal^{EPV}-Gal4/UAS-dad; UAS-salm/+* (C'''-E'''). Los discos imaginales fueron hibridados con sondas para los genes CG32372 (D-D'') y CG17278 (E-E''). En las alas adultas se aprecia una disminución de la región central así como alteraciones en el patrón de venas en ausencia de *sal* (C' comparado con C) y en la condición de sobreexpresión de *dad* (C'' comparado con C). Este último fenotipo se corrige en parte co-expresando *salm* junto con *dad* (C''' comparado con C''). La expresión de CG32372 y CG17278 se reduce en discos con sobre-expresión de *dad*, y esta bajada de la expresión no se revierte por la sobre-expresión de *salm* (D''' y E''' comparado con D'' y E'').

que un 54% muestra un cambio de expresión en discos de ala de genotipo *UAS-dicer2/+; sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salm-i/+*, siendo en la mayoría de ellos (40%) un aumento en la región central del disco imaginal de ala (Figura 17 y Figura 18). En un 14% de casos observamos, de manera contradictoria con lo encontrado en los experimentos de

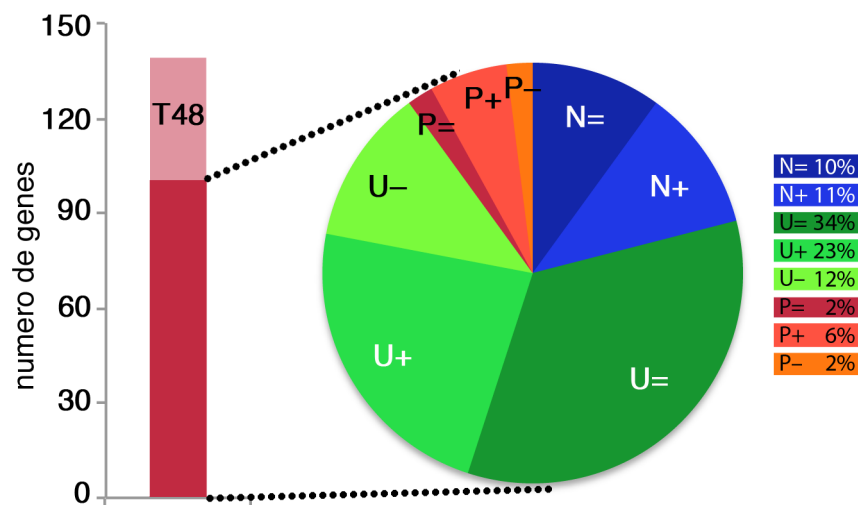


Figura 17. Frecuencia de patrones de expresión de los genes *Sal+*. A la izquierda se representa el número de genes reprimidos seleccionados (barra rojo oscuro) y descartados para el análisis de expresión por hibridación *in situ* (barra rojo claro). A la derecha, se representa en un diagrama circular el porcentaje de patrones de expresión identificados (N, sin expresión, U, generalizada y P, con patrón específico) y su cambio en fondo mutante: sin cambio (=), disminuyen (-) y aumentan (+).

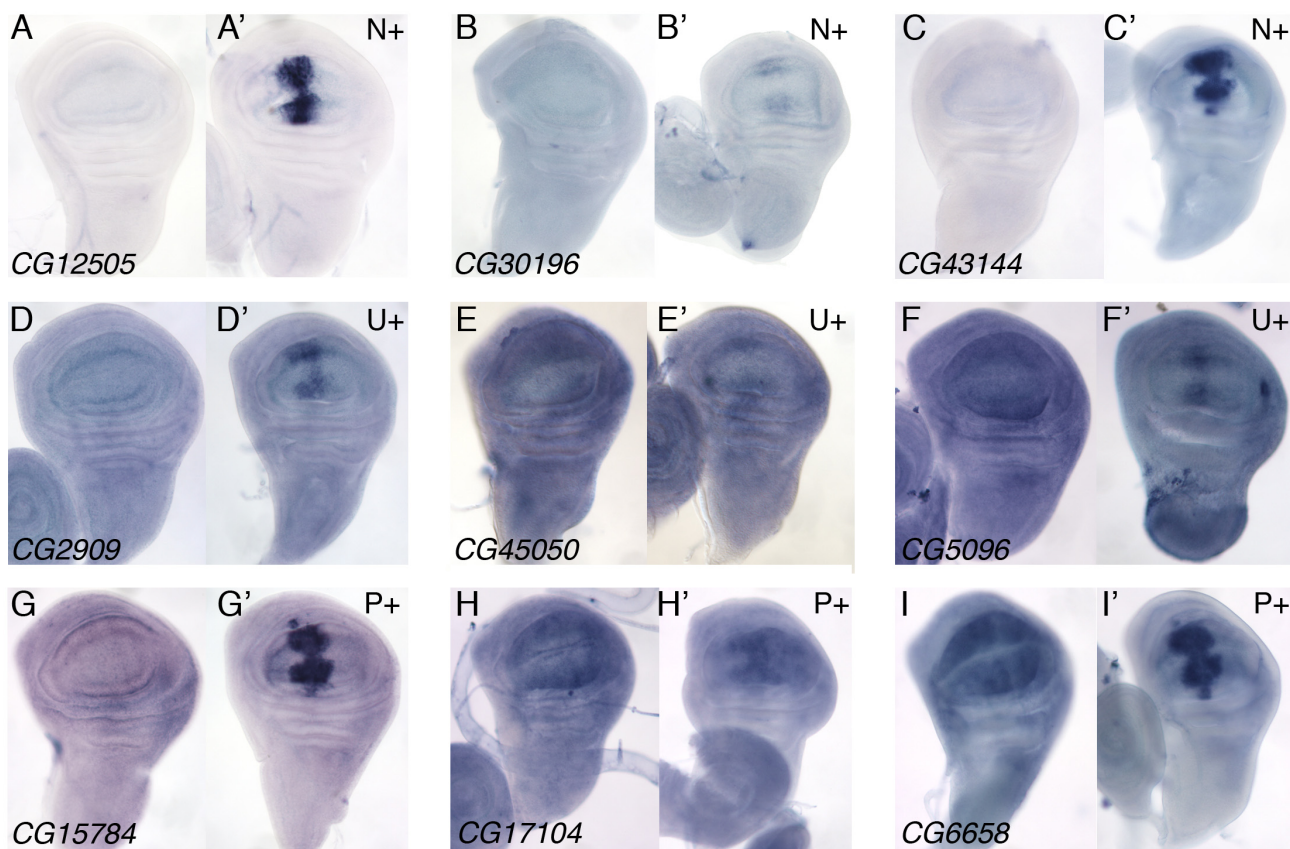


Figura 18. Ejemplos de hibridaciones *in situ* de genes *Sal+* que presentan cambios en discos mutantes para *sal*. (A-I') Hibridaciones *in situ* de discos de ala de tercer estadio larvario en fondo silvestre (A-I) y en fondo *UAS-dicer; sal^{EPV}-Gal4/UAS-salm-i; UAS-salr-i /+* (A'-I'). Para cada caso se muestra en la parte inferior el gen contra el que se ha realizado la sonda AS y en la esquina superior derecha a qué categoría pertenece según su expresión y el tipo de cambio.

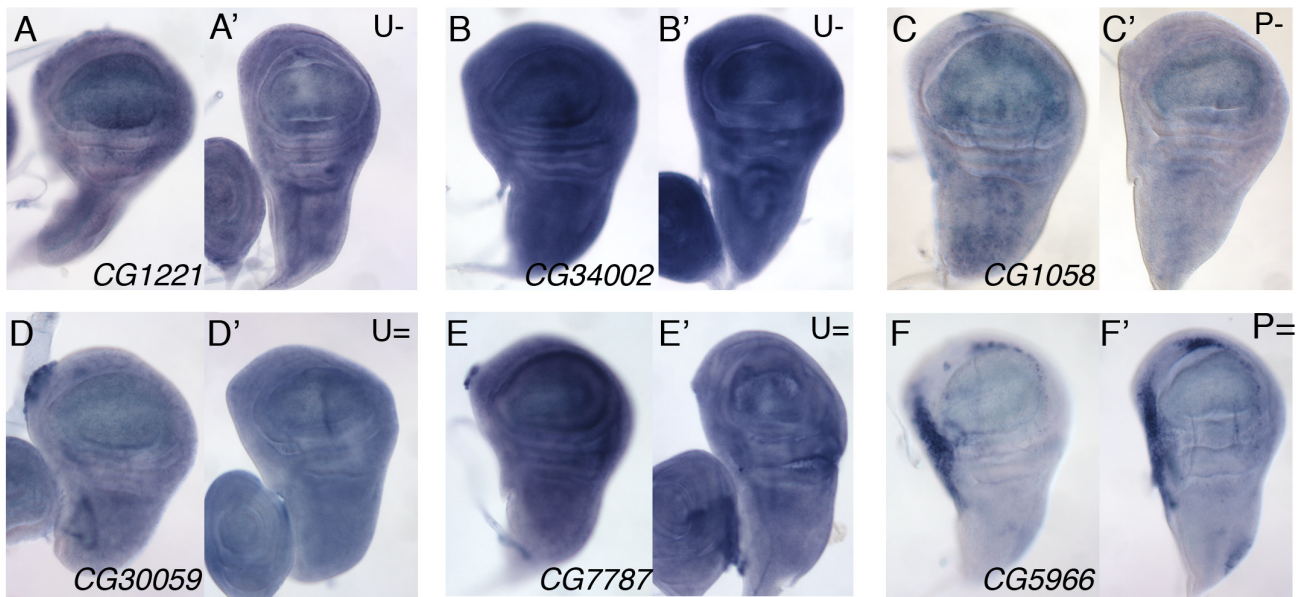


Figura 19. Ejemplos de hibridaciones *in situ* de genes Sal+ que no presentan cambios o disminuyen su expresión en discos mutantes para sal. (A-F') Hibridaciones *in situ* de una representación de genes sal+ cuya expresión disminuye (A-C') o no cambia (D-G') en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario de genotipo *UAS-dicer; sal^{EPv}-Gal4/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (A'-G') frente a discos silvestres (A-G). En la parte inferior se señala el gen contra el que se ha realizado la sonda AS y en la superior derecha a que categoría pertenece según su expresión y el tipo de cambio.

microarrays, una disminución de la expresión (Figura 17 y Figura 19A-C'). En el 46% restante no encontramos ningún cambio apreciable en su expresión en discos *salm-i/salr-i* (Figura 17 y Figura 19D-F'). Todos los datos de expresión de los genes Sal- se presentan en las figuras suplementarias 5-9.

La reducción de la expresión de Sal en la región central del disco imaginal de ala da lugar a una activación ectópica de la ruta de las Jun-N Kinasas (JNK) (Organista y de Celis, 2013). Debido a que esta ruta puede regular la expresión génica a través de los factores de transcripción JUN y FOS (Hess et al., 2004), nos preguntamos si los genes cuya expresión aumenta tras la falta de Sal están siendo activados por la ruta JNK. Para distinguir entre una regulación directa por Sal o indirecta a través de la ruta JNK realizamos hibridaciones *in situ* con las mismas sondas de ARN utilizadas anteriormente en los siguientes fondos genéticos: *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (control) y *sal^{EPv}-Gal4/UAS-salm-i; UAS-salr-i/UAS-puc*. En este último genotipo se bloquea la actividad de la ruta JNK mediante la expresión ectópica de *puc*, la fosfatasa de la ruta que inhibe Bsk (Martin-Blanco et al., 1998). Encontramos que la expresión ectópica de *puc* suprime la expresión en la región central del ala de 8 de los 40 genes analizados (Figura 20A). Algunos de estos genes no se expresan en individuos silvestres (3/11; Figura 20A y C-E'), otros se expresan de manera generalizada (4/23; Figura 20A y F-J'), y tan sólo un gen se expresa con patrón restringido (1/6; Figura 20A y K-K'). Los genes que encontramos dependientes de JNK presentan, por norma general, unos valores de FC a T24h muy bajos, sin embargo a T48h presentan valores similares a los de los genes independientes la ruta JNK (Figura 20B), lo que es compatible con que sufran

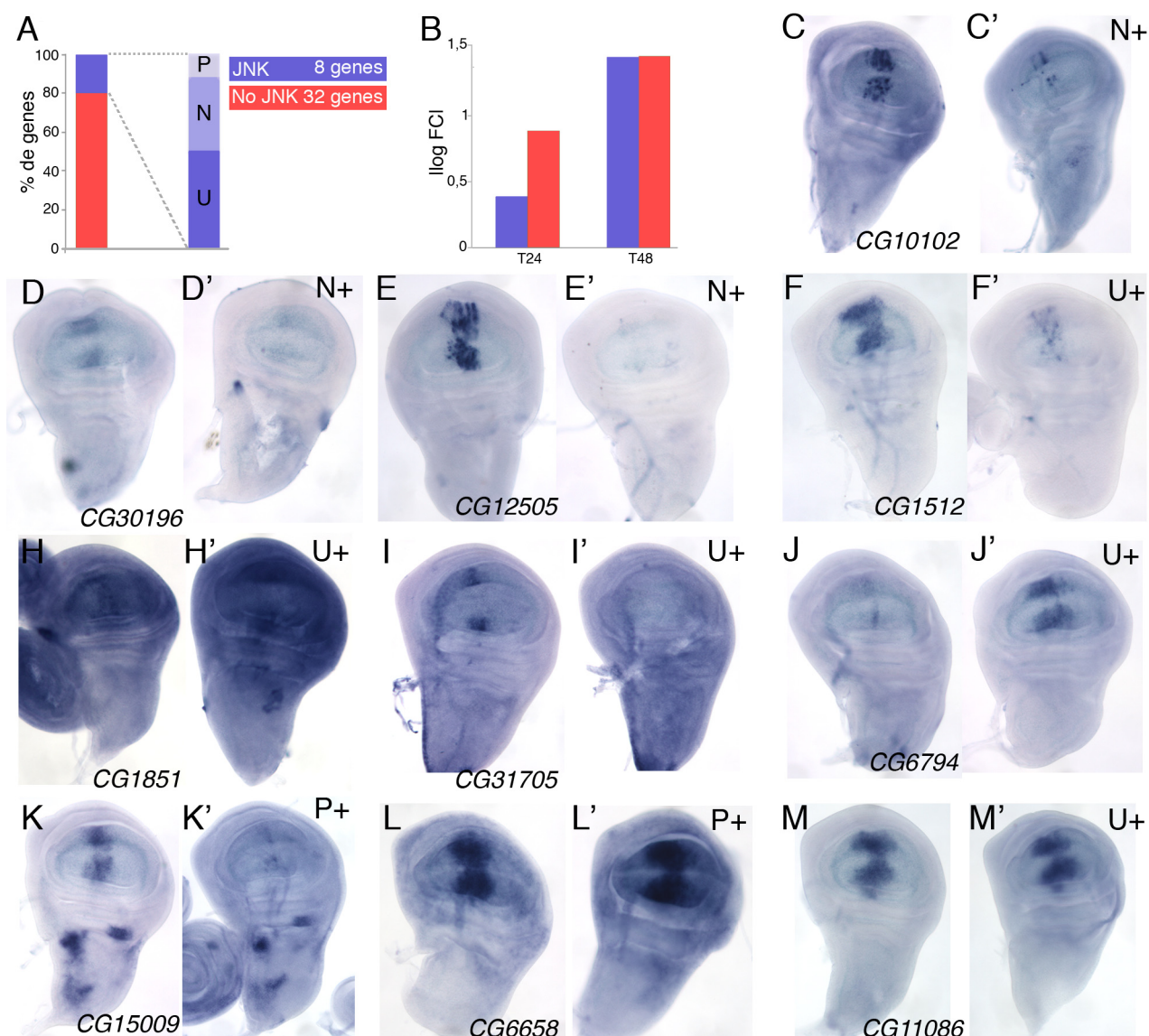


Figura 20. Análisis de la expresión ectópica mediada por JNK en la condición de atenuación de *sal*. (A) Gráfico que representa el porcentaje de genes cuya sobre-expresión detectada en fondo *sal* depende de la activación de la ruta JNK (morado, 20%) respecto a los que no depende (rojo 80%) y clasificación de estos genes según su expresión (N, sin expresión, U, generalizada y P, con patrón específico). (B) Media de los valores de FC que presentan los genes dependientes de JNK (morado) y los no dependientes (rojo) a T24 y T48, observamos que a T24 los dependientes de JNK presentan valores de FC más bajos respecto a los no dependientes, y que esta diferencia no se mantiene a T48. (C-M') Discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (C-M; control) y *sal^{EPV}-Gal4/UAS-salm-i; UAS-salr-i/UAS-puc* (C'-M'). En la parte inferior se muestra el gen reconocido por la sonda AS en cada caso, y en la superior derecha la categoría según tipo de expresión y cambio observado. (C-K') Genes que disminuyen su expresión en condición de bloqueo de la ruta JNK. (L-M') Ejemplo de genes que mantienen la sobre-expresión al bloquear la ruta JNK.

una regulación indirecta de su expresión por parte de las proteínas Sal a través de la ruta JNK. Todos los valores de expresión en condición de bloqueo de la ruta JNK se presentan en la Figura suplementaria 10.

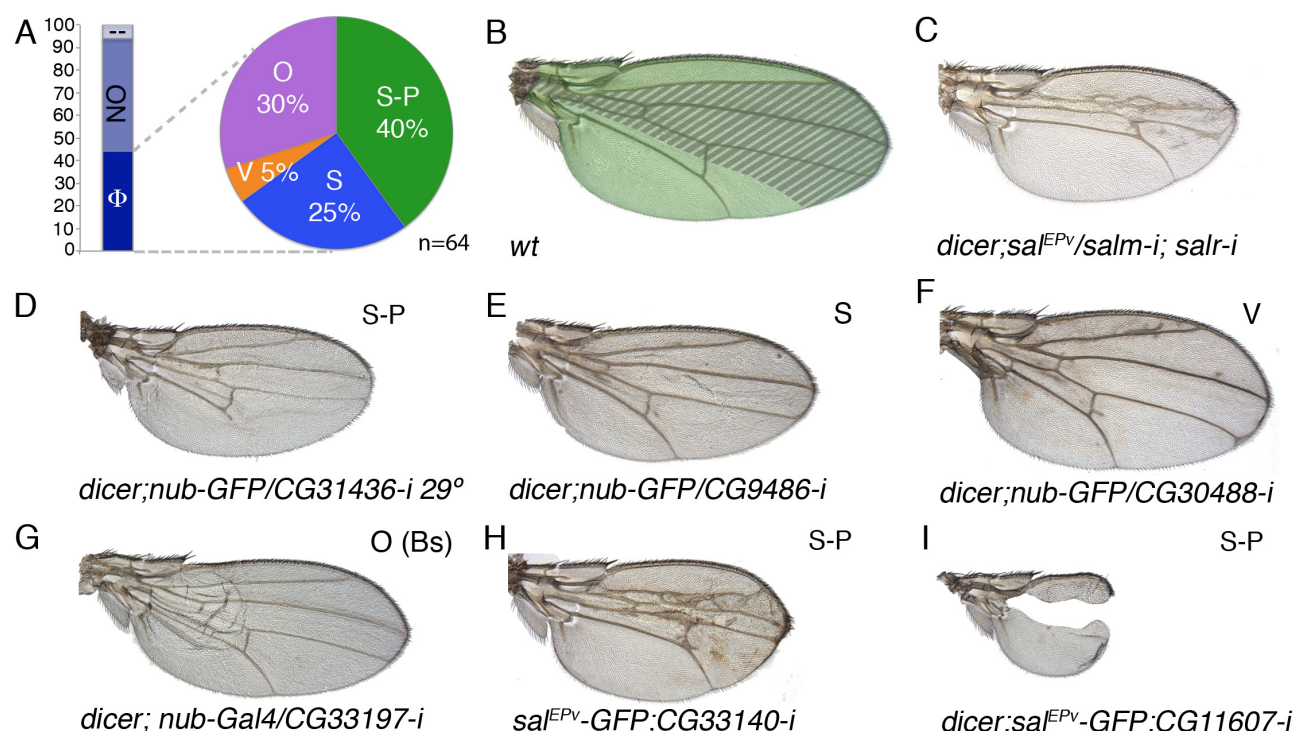


Figura 21. Ejemplo representativo de las categorías fenotípicas encontradas para los genes Sal-.

(A) Representación gráfica del porcentaje de genes activados para los que no se pudo realizar el abordaje experimental (--), los que no modifican el fenotipo silvestre (NO) y los que sí lo modifican (Φ). Dentro de esta última clase representamos en el diagrama circular la frecuencia de fenotipos encontrados: S-P (verde), modifican tamaño y patrón; S (azul), sólo tamaño; V (naranja), sólo patrón y O (Morado), otro tipo de modificación. (B) Ala silvestre, donde se señala el territorio de expresión de *nub-Gal4* (verde) y *sal^{EPV}-Gal4* (rayado gris). (C) Ala resultante de la disminución de *sal* (*UAS-dicer2*; *sal^{EPV}-Gal4/UAS-salm-i*; *UAS-salr-i/+*). (D-G) Alas en las que se ha dirigido el ARNi del gen indicado (*nub-Gal4*), mostrando un ala de cada categoría. (H-I) Alas en las que se ha dirigido el ARNi indicado en la región central (*sal^{EPV}-Gal4*). (B-I) Se indica en la parte inferior el genotipo y si han sido crecidas a una temperatura diferente de 25°C. (D-I) Se indica en la parte superior derecha a qué categoría fenotípica pertenece cada ala según el tipo de modificación observado.

Los resultados anteriores sugieren que las proteínas Sal en el disco de ala podrían funcionar como activadores o como represores transcripcionales. Asimismo, dentro del grupo de genes que sufre un cambio en su expresión en respuesta a *sal*, hemos podido identificar un conjunto de 8 genes regulados por la ruta JNK y dos genes regulados por la ruta Dpp independientemente de Sal.

2. Análisis funcional de genes regulados por Sal.

Hemos realizado un análisis funcional de los genes candidatos identificados, para lo cual caracterizamos sus fenotipos de falta de función, y posteriormente hemos seleccionado dos procesos en los que las proteínas Sal desempeñan una función central: la formación del patrón de venas y la regulación de la actividad de la ruta JNK en la región central del ala.

2.1 Análisis del requerimiento funcional de los genes candidatos durante la formación del ala de *Drosophila*.

Los experimentos de microarrays y el estudio de los patrones de expresión de los genes identificados revelan que el disco imaginal de ala sufre cambios sustanciales en su apogenoma tras reducir la expresión de *sal*. Con el fin de identificar la manera en la que estos genes cuya expresión está alterada podrían contribuir a las funciones descritas para Sal, llevamos a cabo el estudio de sus fenotipos de falta de función. Para ello se utilizó una combinación de las técnicas Gal4/UAS y ARN de interferencia (ARNi), reduciendo en todo el territorio del ala y la axila los niveles de ARNm de cada gen (*nub-Gal4/UAS-ARNi*; Figura 21B verde). En los casos en que estas combinaciones resultaron en la ausencia de ala o en letalidad durante el estadio pupal, realizamos las combinaciones utilizando la estirpe *sal^{EPV}-Gal4*, que se expresa en la zona del ala situada entre la vena L2 y la intervena 4-5 (Figura 21B rayado gris). En ambos casos los cruces se realizaron en fondo de sobre-expresión de la proteína Dicer2 (*UAS-dicer2*), que aumenta la eficiencia de interferencia.

2.1.1 Requerimientos funcionales de los genes candidatos a ser activados por Sal.

La mayoría de los genes identificados como candidatos a ser activados por Sal (n=147) se expresan en el disco imaginal de ala silvestre. Cuando llevamos a cabo una reducción de la expresión de estos genes mediante la expresión de sus ARNi observamos que en un 50% de los casos no se afecta el desarrollo del ala. En el resto de los genes analizados (n=64, 44%), observamos defectos variados en el fenotipo de las alas (Figura 21 y Figura S11). En un 6% de casos no se pudo desarrollar este abordaje experimental debido a la falta de las líneas UAS-ARNi (Figura 21A). Parte de las combinaciones *nub-Gal4/UAS-ARNi* presentan letalidad (14/64), y en estos casos estudiamos el fenotipo de falta de función en condiciones en las que dirigimos la expresión del ARNi a una región más restringida del ala (*sal^{EPV}-Gal4*), observando variaciones en el tamaño del ala acompañadas de defectos en la formación del patrón de venas (Figura 21H y Figura S11). Los fenotipos más extremos consistieron en la desaparición total de la región del ala en la que se expresa el ARNi (Figura 21I).

En las combinaciones estudiadas encontramos modificaciones del tamaño del ala acompañadas por una alteración del patrón venas (S-P, 40% y Figura 21A y D y Figura S11), así como otras clases fenotípicas que consisten en la reducción del tamaño del ala sin efectos sobre la posición de las venas (S, 25%; Figura 21A y E Figura suplementaria 10), y modificaciones, por falta o exceso, en el número de venas (V, 5%; Figura 21A y F y Figura S11). Finalmente, también encontramos fenotipos en los que se observa la aparición de ampollas por fallos en la adhesión de las superficies dorsal y ventral del ala, o falta de estructuras en el margen del ala (O, 30% y Figura 21A y G y Figura S11). Del conjunto de genes analizados tomamos como mejores candidatos a participar en las funciones biológicas de Sal a aquellos que presentan un fenotipo relacionado con el de los mutantes *sal* (cambios en el tamaño o en el tamaño y el patrón de venas). Dentro de éstos elegimos aquéllos cuya expresión *in*

situ disminuye en ausencia de Sal, considerándolos los mejores candidatos a ser regulados por Sal y participar en su función (Tabla 1).

2.1.2 Requerimiento de los genes candidatos a ser reprimidos por Sal.

Para el conjunto de genes candidatos a ser reprimidos por Sal realizamos el mismo abordaje experimental. En este caso, una fracción de estos genes no se expresa en el disco imaginal de ala, y su contribución al fenotipo de los mutantes *sal* debería ser causada por su sobre-expresión. El análisis de la falta de función se realizó con todo este conjunto de genes ya que una mayoría se expresa en el disco de ala de manera normal, y podría tener requerimientos funcionales en su formación. En un 9% de ellos no pudimos llevar a cabo los experimentos por falta de las líneas UAS-ARNi necesarias.

Encontramos que en un 66% de las combinaciones analizadas las alas presentan fenotipo silvestre. Para el 25% que sí presenta cambios en la morfología del ala (n=35) observamos defectos en el tamaño y el patrón de venas en el 34% de los casos (S-P, Figura

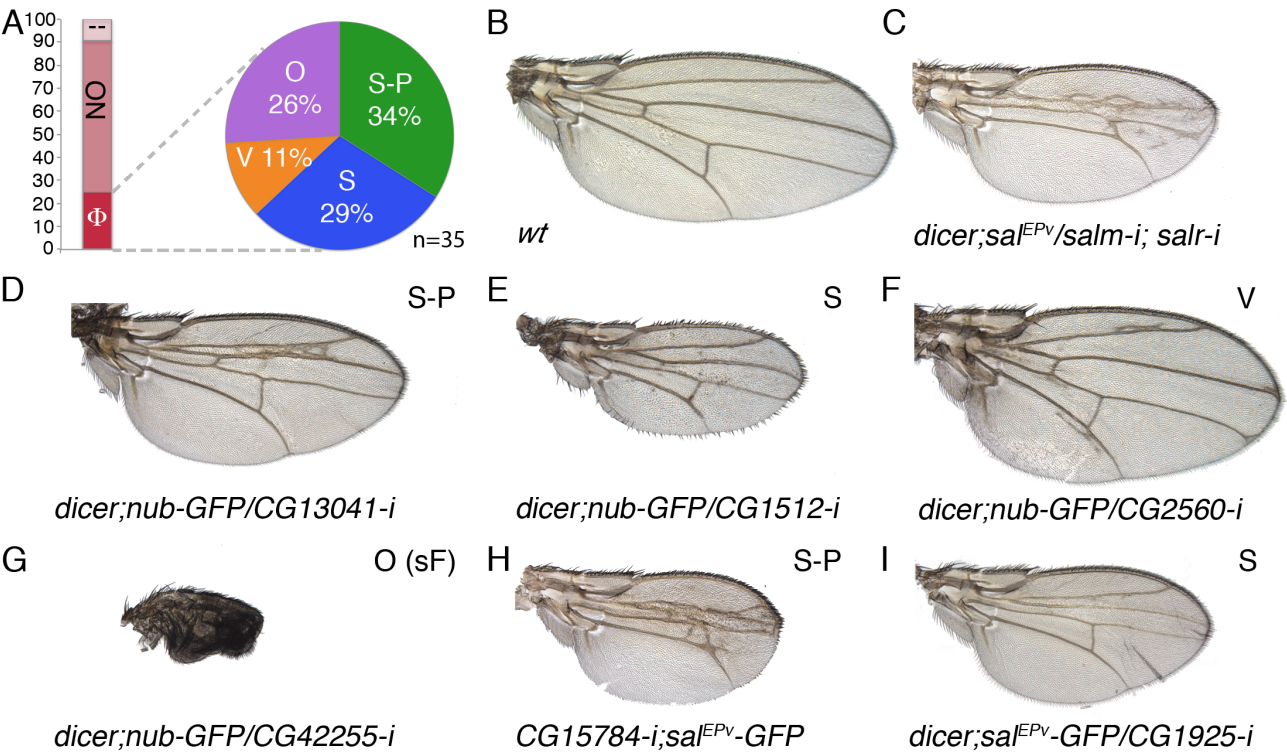


Figura 22. Ejemplos representativos de las categorías fenotípicas encontradas para los genes *Sal+*. (A) Representación gráfica del porcentaje de genes reprimidos para los que no se pudo realizar el abordaje experimental (--), los que no modifican el fenotipo silvestre (NO) y los que sí lo modifican (φ). Dentro de esta última clase representamos en el diagrama circular la frecuencia de fenotipos encontrados: S-P (verde), modifican tamaño y patrón; S (azul), sólo tamaño; V (naranja), sólo patrón u O (Morado), otro tipo de modificación. (B) Ala silvestre. (C) Ala en condición de disminución de *sal* (*UAS-dicer2; sal^{EPV}-Gal4/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+*). (D-G) Alas en las que se ha dirigido el ARNi del gen indicado (*nub-Gal4*). (H-I) Alas en las que se ha dirigido el ARNi indicado en la región central (*sal^{EPV}-Gal4*). (B-I) Se indica en la parte inferior el genotipo. (D-I) Se indica en la parte superior derecha la categoría fenotípica a la que pertenece cada ala según el tipo de modificación observado.

22A y D y Figura S12), en el tamaño en el 29% (S, Figura 22A y E y Figura S12), en la correcta diferenciación de las venas en el 11% (V, Figura 22A y F y Figura S12) y otros tipos de defectos en el 26% de los casos (O, Figura 22A y G y Figura S12). 9 de los 35 genes presentan letalidad o ausencia total del ala al dirigir la expresión del ARNi con *nub-Gal4*, por lo que restringimos la expresión de los ARNi utilizando la línea *sal^{EPV}-Gal4*. En esta condición encontramos que todos presentan defectos tanto en el tamaño del ala como en el patrón de venas (Figura 22H-I).

Teniendo en cuenta que la relación de Sal con este grupo de gen es mediante represión, hemos tomado como mejores candidatos aquellos genes en los que observamos, mediante hibridación *in situ*, que había expresión ectópica en la región central del ala en respuesta a la ausencia de Sal, independientemente del fenotipo del ala en su falta de función (Tabla 2). Como para estos genes encontramos expresión ectópica en situaciones de disminución de *sal*, decidimos disminuir su expresión en un fondo genético mutante para *sal* (*sal^{EPV}-Gal4 UAS salm-i/UAS-RNAi; UAS salr-i/+*). En estas combinaciones no encontramos en ninguno de los casos que la disminución de cada gen modifique el fenotipo de las alas *salm-i; salr-i*, lo que es compatible con una contribución aditiva a este fenotipo de varios genes sobre-expresados simultáneamente.

2.2 Análisis de Ontología Génica (GO)

Para identificar si los 286 genes seleccionados comparten características moleculares comunes con los procesos en los que participan las proteínas Sal, los hemos agrupado según las anotaciones informáticas descritas para sus correspondientes proteínas en los siguientes grupos:

CG: proteínas que no tienen ningún dominio funcional descrito.

CGh: proteínas que contienen dominios funcionales conservados pero sin ortólogos en otras especies.

D, R y P: proteínas relacionadas con la biología del ADN, ARN y las proteínas, respectivamente.

CA+Cyt: proteínas relacionadas con la adhesión celular y el citoesqueleto.

CS: proteínas que forman parte de rutas de señalización.

M: proteínas asociadas al metabolismo de lípidos o carbohidratos.

Red-Ox: proteínas relacionadas con procesos de oxido-reducción.

Tra: proteínas implicadas en el transporte de metabolitos a través de la membrana.

Cut: componentes de la cutícula.

Neu: neurotransmisores y otras proteínas relacionadas con la fisiología del sistema nervioso.

CD: proteínas implicadas en muerte celular.

CDiv: proteínas implicadas en división celular.

CR: genes que no codifican proteínas o pseudogenes.

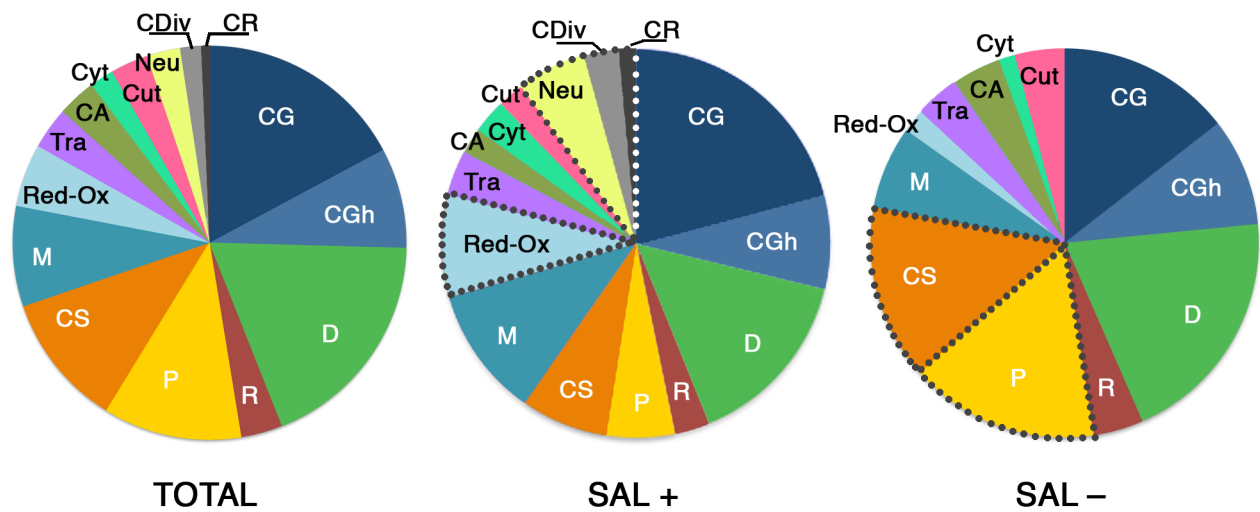


Figura 23. Representación gráfica de la distribución de los genes seleccionados según su naturaleza molecular. A la izquierda se representa la distribución de todo el conjunto de genes, en el centro, la de los seleccionados como reprimidos por Sal y a la derecha la de los activados. Se destacan dentro de una línea punteada las clases que varían mucho su representación comparando genes activados y reprimidos. Cada una de las siglas vienen especificadas en el texto.

Lo primero que observamos es que la mayoría de los genes que encontramos pertenecen a los grupos **CG** y **CGh** (26%), que incluyen a aquéllos para los que no hay ninguna función descrita. Entre los genes que sí que tienen una función conocida, la categoría más representada es la de genes relacionados con la biología del ADN (**D**), siendo en su mayoría factores de transcripción y modificadores de la expresión génica. Esta prevalencia sugiere que la falta de Sal podría dar lugar a cambios en la expresión génica a través de diferentes intermediarios. También encontramos que un 11% de los genes está relacionado con la señalización celular (**CS**). Si llevamos a cabo este mismo análisis diferenciando los genes reprimidos (Sal+) de los genes activados (Sal-), no encontramos cambios sustanciales en la distribución. Sólo cabe destacar las categorías **Red-Ox** y **CDiv** con un mayor peso en los genes reprimidos, y las categorías **P** y **CS**, mucho más representadas para los genes activados (Figura 23).

Para identificar si en nuestros listados de genes existe un enriquecimiento de términos GO en la categoría “procesos biológicos” utilizamos el software DAVID (Huang da et al., 2009a; b). Analizamos 3 listados de genes: genes que cambian su expresión de manera

significativa en el experimento de microarray a T24 (Sal 24h, 686 genes), genes que cambian su expresión significativamente y con un $\log FC > 1$ (Sal, 286 genes) y los mejores candidatos a ser regulados por *sal* definidos por criterios de hibridación *in situ* y fenotipo (SBC, 74 genes). Para cada uno de los listados discernimos entre los genes que aumentan (+) o disminuyen (–) su expresión en respuesta a la bajada de Sal (Tabla 3).

Para el primer listado, genes Sal 24h+ (354 genes) sólo encontramos enriquecidas categorías relacionadas con procesos de oxido-reducción y biosíntesis de carbohidratos (Tabla 3; Sal 24h+). En cambio para los genes Sal 24h– encontramos muchas más categorías enriquecidas significativamente, de las que cabe destacar “regulación de la expresión génica” (p-valor= $8 \cdot 10^{-4}$), “regulación de la muerte celular programada” (p-valor= $5 \cdot 10^{-3}$), “especificación de venas del ala” (p-valor=0,02) y “determinación del destino celular” (p-valor=0,03). Cuando este mismo abordaje lo llevamos a cabo con un grupo más restringido de genes, el segundo listado de genes descritos (286 genes), encontramos valores de enriquecimiento más significativos. Para los genes Sal+ (139 genes) encontramos enriquecidos términos GO relacionados con el control de la expresión génica. Para los genes Sal– (147 genes) observamos que las categorías más enriquecidas están relacionadas con la regulación del ciclo celular. También encontramos numerosas categorías relacionadas con la respuesta inmune y otros términos asociados al desarrollo de tejidos y la morfogénesis celular (Tabla 3).

Cuando reducimos el estudio a los mejores candidatos a ser regulados por Sal, tercer listado de genes (74 genes), observamos que para los reprimidos (SCB+, 40 genes) encontramos funciones tales como “Procesos metabólicos del ADN” (p-valor= $8 \cdot 10^{-3}$), “Respuesta celular al daño en el ADN” (p-valor=0,01), “cascadas de señalización intracelular” (p-valor=0,02) y “organización de los telómeros” (p-valor=0,03). En cambio, para los genes activados (SBC-, 34 genes) encontramos también que las categorías más enriquecidas están relacionadas con la regulación del ciclo celular (Tabla 3). También encontramos enriquecidos términos relacionados con el desarrollo y morfogénesis de órganos y tejidos. Es de destacar que dentro de los genes activados existen categorías enriquecidas relacionadas con funciones conocidas para Sal como son la regulación del ciclo celular, la apoptosis o el desarrollo de tejidos, mientras que el enriquecimiento en el caso de los genes reprimidos se limita a la regulación y biología del ADN.

Sal 24h -			
Termino GO	n° gens	%	p-valor
regulation of gene expression	34	11,5	0,00088
positive regulation of cellular process	16	5,4	0,0009
posttranscriptional gene silencing by RNA	6	2	0,00094
regulation of macromolecule metabolic process	36	12,2	0,0015
regulation of macromolecule biosynthetic process	29	9,8	0,0045
centrosome cycle	5	1,7	0,0048
regulation of programmed cell death	8	2,7	0,0054
cellular amino acid derivative metabolic process	6	2	0,0062
regulation of cell death	8	2,7	0,0066
positive regulation of RNA metabolic process	7	2,4	0,0076
regulation of cellular biosynthetic process	29	9,8	0,008
regulation of biosynthetic process	29	9,8	0,008
centrosome organization	5	1,7	0,0091
anatomical structure homeostasis	5	1,7	0,0091
negative regulation of gene expression	12	4,1	0,01
positive regulation of cell death	5	1,7	0,011
positive regulation of programmed cell death	5	1,7	0,011
post-embryonic organ development	13	4,4	0,012
microtubule organizing center organization	5	1,7	0,012
regulation of primary metabolic process	31	10,5	0,017
mitosis	8	2,7	0,022
imaginal disc-derived wing vein specification	4	1,4	0,023
cellular response to DNA damage stimulus	6	2	0,024
nuclear division	8	2,7	0,024
M phase of mitotic cell cycle	8	2,7	0,024
positive regulation of gene expression	7	2,4	0,025
myofibril assembly	3	1	0,029
locomotion involved in locomotory behavior	3	1	0,029
brain morphogenesis	3	1	0,029
positive regulation of nitrogen compound metabolic process	7	2,4	0,029
positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	7	2,4	0,029
biogenic amine metabolic process	4	1,4	0,029
regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	26	8,8	0,032
neuromuscular process	3	1	0,033
telomere organization	3	1	0,033
regulation of nitrogen compound metabolic process	26	8,8	0,033
cell fate commitment	10	3,4	0,035
instar larval or pupal morphogenesis	13	4,4	0,035
regulation of cellular metabolic process	30	10,2	0,035
actomyosin structure organization	4	1,4	0,036
positive regulation of macromolecule biosynthetic process	7	2,4	0,038
post-embryonic morphogenesis	13	4,4	0,039
M phase	16	5,4	0,041
larval development	5	1,7	0,042
negative regulation of macromolecule metabolic process	12	4,1	0,042
organ development	31	10,5	0,044
metamorphosis	13	4,4	0,046
tissue development	15	5,1	0,046
post-embryonic organ morphogenesis	11	3,7	0,047
imaginal disc morphogenesis	11	3,7	0,047

Sal 24h +			
Termino GO	n° gens	%	p-valor
cell redox homeostasis	6	1,9	0,0029
carbohydrate biosynthetic process	6	1,9	0,0037
hydrogen peroxide catabolic process	3	0,9	0,017
hydrogen peroxide metabolic process	3	0,9	0,017
cellular response to oxidative stress	3	0,9	0,023
response to reactive oxygen species	3	0,9	0,039
Sal -			
Termino GO	n° gens	%	p-valor
negative regulation of cell proliferation	5	3,9	0,0001
regulation of cell proliferation	5	3,9	0,0015
innate immune response	5	3,9	0,0082
regulation of signal transduction	8	6,3	0,0130
negative regulation of cellular process	11	8,7	0,0170
regulation of cell communication	8	6,3	0,0180
positive regulation of cellular process	8	6,3	0,0180
regulation of immune effector process	3	2,4	0,0180
regulation of production of molecular mediator of immune response	3	2,4	0,0180
regulation of antimicrobial peptide production	3	2,4	0,0180
regulation of response to stress	4	3,1	0,0210
defense response to fungus	3	2,4	0,0210
defense response to bacterium	4	3,1	0,0220
antimicrobial humoral response	4	3,1	0,0230
regulation of cellular biosynthetic process	15	11,8	0,0230
regulation of biosynthetic process	15	11,8	0,0230
response to fungus	3	2,4	0,0240
regulation of antimicrobial humoral response	3	2,4	0,0240
regulation of humoral immune response	3	2,4	0,0240
regulation of response to biotic stimulus	3	2,4	0,0240
aminoglycan catabolic process	3	2,4	0,0310
regulation of organ growth	3	2,4	0,0310
response to bacterium	4	3,1	0,0320
polysaccharide catabolic process	3	2,4	0,0330
regulation of defense response	3	2,4	0,0350
cell morphogenesis	9	7,1	0,0370
tissue development	9	7,1	0,0380
regulation of immune response	3	2,4	0,0470
Sal +			
Termino GO	n° gens	%	p-valor
posttranscriptional gene silencing by RNA	3	2,3	0,033
negative regulation of gene expression	6	4,7	0,035
anatomical structure homeostasis	3	2,3	0,037
regulation of gene expression	13	10,1	0,042

SBC -			
Termino GO	nº gens	%	p-valor
negative regulation of cell proliferation	3	9,4	0,002
regulation of cell proliferation	3	9,4	0,008
tissue development	5	15,6	0,018
imaginal disc morphogenesis	4	12,5	0,028
post-embryonic organ morphogenesis	4	12,5	0,028
post-embryonic organ development	4	12,5	0,031
regulation of cell development	3	9,4	0,038
organ development	7	21,9	0,043
instar larval or pupal morphogenesis	4	12,5	0,046
behavioral response to ethanol	2	6,2	0,046
post-embryonic morphogenesis	4	12,5	0,048
SBC +			
Termino GO	nº gens	%	p-valor
DNA metabolic process	4	11,4	0,0086
cellular response to DNA damage stimulus	3	8,6	0,012
intracellular signaling cascade	4	11,4	0,019
telomere organization	2	5,7	0,029

Tabla 3. Análisis de Ontología génica GO. Términos GO relacionados con procesos biológicos identificados por el programa DAVID para cada uno de los grupos de genes (Sal 24h; Sal y SCB, distinguiendo entre activados (-) y reprimidos (+)), se muestran cuántos genes se relacionan con cada categoría (genes), qué porcentaje suponen del conjunto total de genes (%) y el p-valor.

2.3 Análisis de la regulación de la posición de la vena L2 del ala de *Drosophila*.

Como hemos indicado anteriormente las proteínas Sal juegan un papel muy importante en la correcta formación del patrón de venas, donde participan en la especificación de las venas L2 y L5. Esta función de Sal se realiza a través de la regulación de los genes *kni* e *iro*, complejos génicos que codifican factores de transcripción que se expresan y dan identidad a las venas L2 (*kni*) y L3 y L5 (*iro*) (Gomez-Skarmeta et al., 1996; Lunde et al., 1998; de Celis y Barrio, 2000). Entre los genes identificados en los experimentos de microarrays dentro de la clase SBC+ nos llamó especialmente la atención *optix*, ya que el fenotipo observado tras su reducción sugiere que su función también se requiere para determinar la posición de la vena L2 (Figura 24A-A')

2.3.1 *optix* como mediador de la posición de la vena L2

optix es el ortólogo de los genes *SIX3/6*, y codifica para un factor de transcripción con homeodominios y dominios de interacción proteína-proteína SIX (Seo et al., 1999). En *Drosophila* se ha estudiado su requerimiento en la formación del ojo (Seimiya y Gehring, 2000) y en la progresión del surco morfogenético (Li et al., 2013), así como en la formación

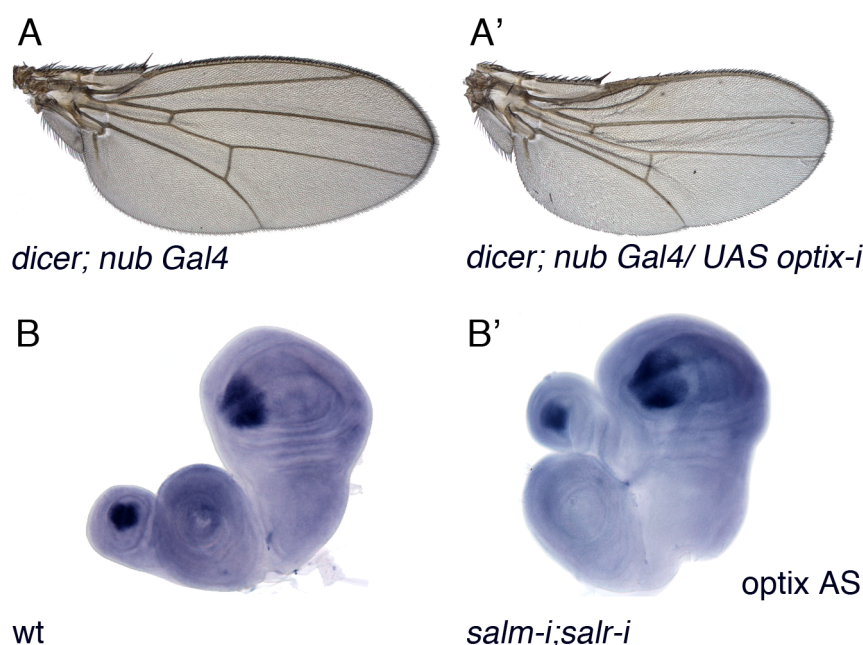


Figura 24. Función de Optix en la formación del ala y expresión de *optix* en el disco imaginal. (A-A') Alas de individuos *UAS-dicer2; nub-Gal4 UAS-GFP* (A; control) y *UAS-dicer2; nub-Gal4 UAS-optix-i* (A') donde se observa un desplazamiento anterior de la vena L2 hacia el margen anterior del ala así como una disminución del tamaño de ésta. (B-B') Hibridación *in situ* con una sonda AS para *optix* en discos de ala, pata T1 y halterio de individuos silvestres (B) y *UAS-dicer2; salm^{EPv}-Gal4/UAS-salm-i; UAS-salm-i/+* (B'). Observamos que *optix* se expresa en la región presuntiva de halterio y complementariamente a *sal* en la región anterior de la región presuntiva de ala (B) y que la expresión de *optix* se extiende por la región central del ala en discos mutantes para *sal* (B').

del neuroepitelio en el cerebro (Gold y Brand, 2014). Aunque se ha descrito su expresión en el disco imaginal de ala (Seimiya y Gehring, 2000), no se ha propuesto ninguna función para *optix* en el desarrollo de ésta. La expresión de *optix* está restringida a un dominio del compartimento anterior que es complementario al de *sal*, y que incluye toda la región comprendida entre la vena L2 y el margen anterior del ala (Figura 24B). La expresión de *optix* se extiende desde este dominio hacia el centro de la región de ala en discos imaginales donde se reduce la expresión de *salm* y *salr*, lo que sugiere que estos genes participan en definir el límite posterior de expresión de *optix* (Figura 24B').

La posición de la vena L2 corresponde en el disco imaginal de ala con el dominio de expresión de *kni* (Lunde et al., 1998). Para estudiar de qué manera *optix* participa en la especificación de la vena L2 analizamos en primer lugar la expresión de *kni* en condiciones de ausencia y de sobre-expresión de *optix* (Figura 25). Encontramos que la falta de *optix* provoca una expansión del dominio de *kni* (Figura 25B-B'), mientras que su sobre-expresión lo elimina de este dominio (Figura 25C-C'). Estos datos indican que Optix reprime la expresión de *kni*, y por tanto participaría en acotar su dominio de expresión a la región de la vena L2. En trabajos previos se ha descrito a Sal como regulador de la expresión de *kni*, proponiéndose que bajos niveles de Sal activan la expresión de *kni* y altos niveles de Sal reprimen

su expresión (de Celis y Barrio, 2000). Confirmamos que en ausencia de *sal* la expresión de *kni* se pierde (Figura 26B). Sin embargo, en condición de sobre-expresión de Salm fuera del territorio donde normalmente se expresa (*nub-Gal4 sal-Gal80.1; UAS sal^{4B}/+*) aparece expresión ectópica de *kni*, tal como observamos en ausencia de *optix* (Figura 26C). La discordancia de estos datos con los anteriormente descritos puede deberse a la diferencia del abordaje experimental, ya que en nuestro caso expresamos Salm sólo en la región presuntiva de ala donde normalmente no se expresan las proteínas Sal.

Para comprender mejor cómo *sal* y *optix* participan en la regulación de la formación de la vena L2 estudiamos la expresión de Kni en una condición de falta de función de *optix* y *sal*, y encontramos que en este caso la falta de Sal no modifica la expresión de Kni (Figura 26D). Estos resultados indican que la activación de *kni* por Sal es mediada por *optix*. En la condición *sal* habría Optix ectópico que inhibiría la expresión de *kni*, y en la situación de sobre-expresión de *sal*, *optix* está reprimido, por lo que no es capaz de reprimir a *kni*.

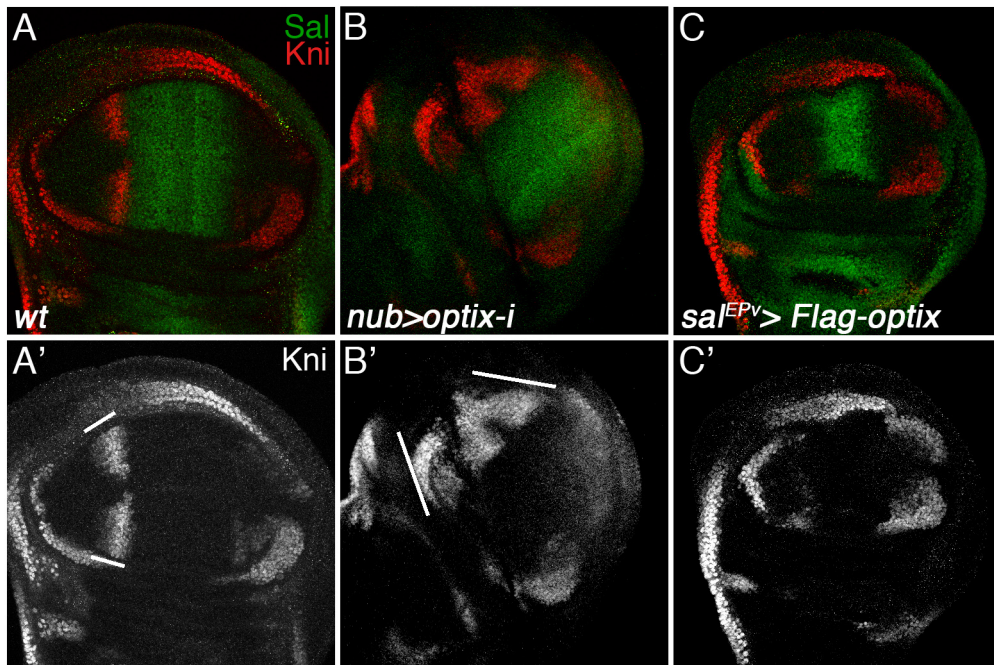


Figura 25. La expresión de *kni* está regulada por Optix. Discos de ala de tercer estadio mostrando la expresión de Salm (verde) y Kni (rojo en A-C y blanco A'-C'). Discos de genotipo silvestre (A-A'), con atenuación de *optix* (*nub-Gal4/UAS-optix-i*; B-B') y con sobre-expresión de *optix* (*sal^{EPV}-Gal4; UAS-Flag-optix*; C-C'). Mediante una línea blanca se señala el territorio de expresión de Kni, restringiéndose a la región presuntiva de L2 en A-A', extendiéndose por el territorio anterior en B-B' y desapareciendo en C-C'.

2.3.2 Estudio de la regulación génica de *knirps*.

En estudios previos se identificó una región de ADN de 1,4 kb, localizada adyacente a los genes *kni* y *knrl*, que dirige la expresión de genes reporteros en la región presuntiva L2 en el disco imaginal de ala (Lunde et al., 2003). Clonamos esta misma región (*EX-lacZ*) en el vector pHPdesteGFP que permite identificar potenciadores que dirigen la expresión de *eGFP* (*kniRR-GFP*). Como es de esperar la construcción *kniRR-GFP* se expresa en las

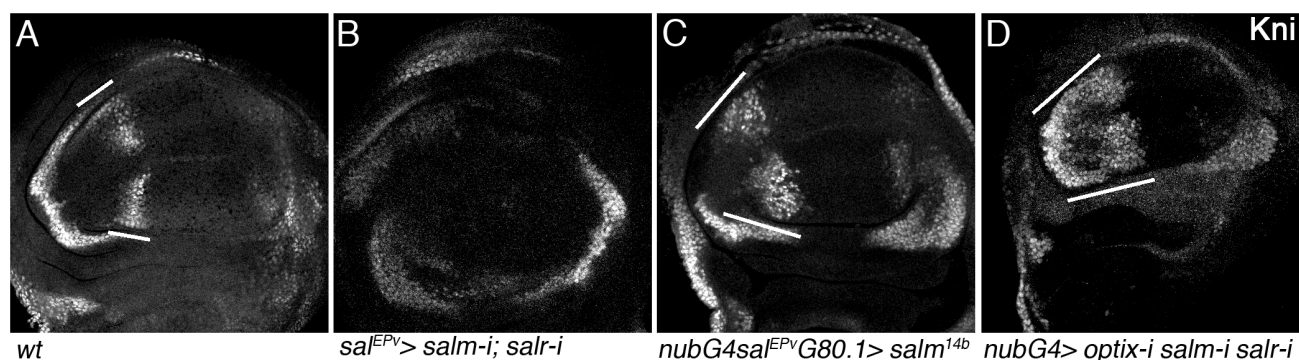


Figura 26. Expresión de *kni* regulada por Sal. Discos de ala de tercer estadio larvario mostrando la expresión de *Kni*. (A) Disco control de genotipo silvestre. (B) Disco de genotipo $sal^{EPV}-Gal4/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+$, donde desaparece la expresión de *Kni* en la región presuntiva de vena L2. (C) Disco de genotipo $nub-Gal4\ sal^{EPV}-Gal80.1; UAS-salm^{14b}$, donde la expresión de *Kni* se extiende por la toda la región anterior y (D) disco de genotipo $nub-Gal4\ UAS-optix-i/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+$, en la que disminuyen los niveles tanto de *optix* como de *sal*, y donde encontramos que la expresión de *Kni* se extiende por toda la región anterior.

células precursoras de la vena L2 (Figura 27C). Para determinar si la regulación de la expresión de *kni* mediada por *optix* es a través de esta región del ADN estudiamos la expresión de *eGFP* en discos $nub > optix-i$, y observamos que *eGFP* se detecta por toda la región de expresión de *optix* al igual que ocurre con la expresión de *kni* en esta misma condición (Figura 27C').

En ese mismo trabajo se identificó un fragmento 5' activador de 0,69 kb y un fragmento 3' represor de 0,7 kb (Lunde et al., 2003). El fragmento de 0,69 kb tiene actividad en todo el dominio de expresión de *optix*. Para comprobar si la regulación mediada por Optix se lleva a cabo en el fragmento 3' represor de 0,7 kb, hicimos una búsqueda *in silico* de sitios

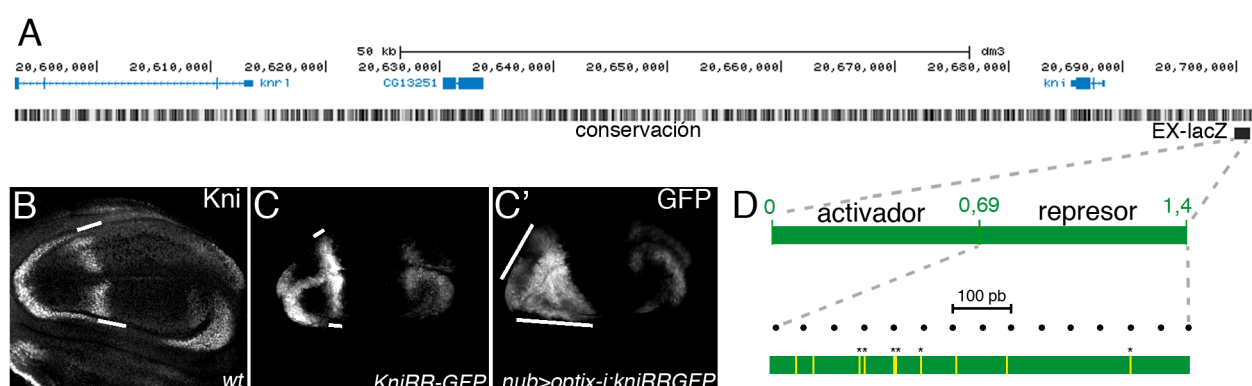


Figura 27. Regulación génica de *kni*. (A) Representación de la región genómica de *kni* y *knr-1* donde se señala en un rectángulo negro la posición de la región EX (Lunde et al., 2003). (B) Disco de ala de tercer estadio mostrando la expresión de *Kni*. (C-C') Discos de ala de larvas de tercer estadio que portan la construcción *Kni-RR-GFP*; esta región dirige la expresión de GFP a la vena L2 (barra blanca en C) y se extiende a la región anterior del disco en condición de atenuación de *optix* ($nub-Gal4\ UAS-optix-i$; C'). (D) Representación de la región EX distinguiendo la región activadora y represora. En el fragmento represor, abajo, se señalan en amarillo los motivos de unión para Optix (* , motivos conservados).

de unión para Optix mediante el software JASPAR (Mathelier et al., 2014). Encontramos 10 sitios de unión de los cuales 6 están conservados en al menos 7 especies de *Drosophila* (Figura 27D), 5 de estos sitios se encuentran muy próximos entre sí. Es muy probable por tanto que Optix reconozca este fragmento y lleve a cabo la represión de *kni* a través de esta región.

2.3.3 Aristaless participa en la activación de Kni.

De los resultados anteriores concluimos que la expresión de *kni* se restringe a la región presuntiva L2 mediante represión mediada por Optix en toda la región anterior. En este modelo, sería necesaria la participación de un activador capaz de promover la expresión de *kni* en el compartimento anterior. Un candidato a mediar esta activación sería el factor de transcripción con dominios homeobox *aristaless* (*al*), que se expresa tanto en el disco de ala como en alas pupales ocupando gran parte del compartimento anterior del ala (Figura 28A-B y Campbell et al., 1993). También se ha observado que alas mutantes para *al* (*al^{ex}*) tienen defectos en la formación de la vena L2 (Figura 28C; Campbell y Tomlinson, 1998). Para estudiar si Al es el responsable de la activación de *kni* en la región anterior de la zona presuntiva de ala analizamos discos de ala de una condición hipomorfa para *al* (*al^{ex}/al^β*). *al^{ex}* es un alelo nulo letal para este gen que se generó mediante la escisión de un elemento P (Campbell y Tomlinson, 1998) y *al^β* es una mutación espontánea que presenta un fenotipo débil en la arista y *scutelum*. Observamos que la expresión de *kni* en esta condición disminuye notablemente (Figura 29A-A'), y que las alas correspondientes presentan defectos en la formación de la vena L2 (Figura 29A'').

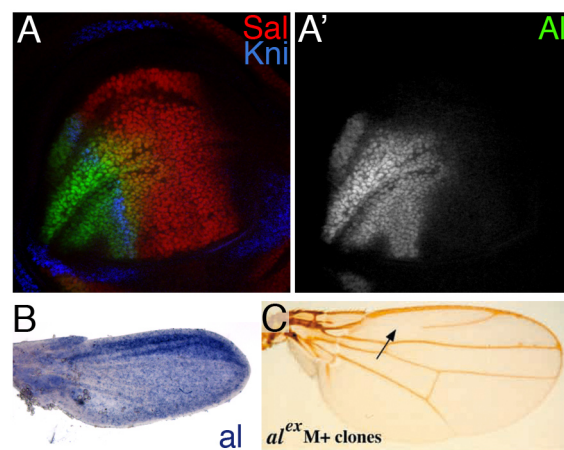


Figura 28. Expresión y función de Al en el desarrollo del ala. (A-A') Disco de ala tercer estadio larvario mostrando la expresión de Salm (rojo), Kni (azul) y Al (verde en A y blanco en A'). (B) Hibridación *in situ* con una sonda contra *al* en ala pupal. El dominio de expresión de Al se extiende por la región anterior del ala solapando con Sal y Kni. (C) Ala homocigota para el alelo nulo *al^{ex}* (tomada de Campbell and Tomlinson (1998). Apreciamos una falta de diferenciación de la vena L2 (flecha) y una disminución del tamaño.

Para entender el papel de Al en la activación de *kni*, analizamos las consecuencias de la sobre-expresión de Al (*nub-Gal4;UAS-al*) sobre el fenotipo de las alas y la expresión en Kni en discos imaginales. Para ello utilizamos las líneas *UAS-al^{β2}* y *UAS-al^β*, y en ambos casos encontramos Kni extendido por toda la región anterior del disco de ala (Figura 29B-C') y la vena L2 se posiciona mal, adquiriendo una localización más anterior y desarrollando órganos sensoriales ectópicos (Figura 29B''-C''). De esta manera, concluimos que una de las funciones de Al en el ala sería la activación de *kni* en el compartimento anterior de la

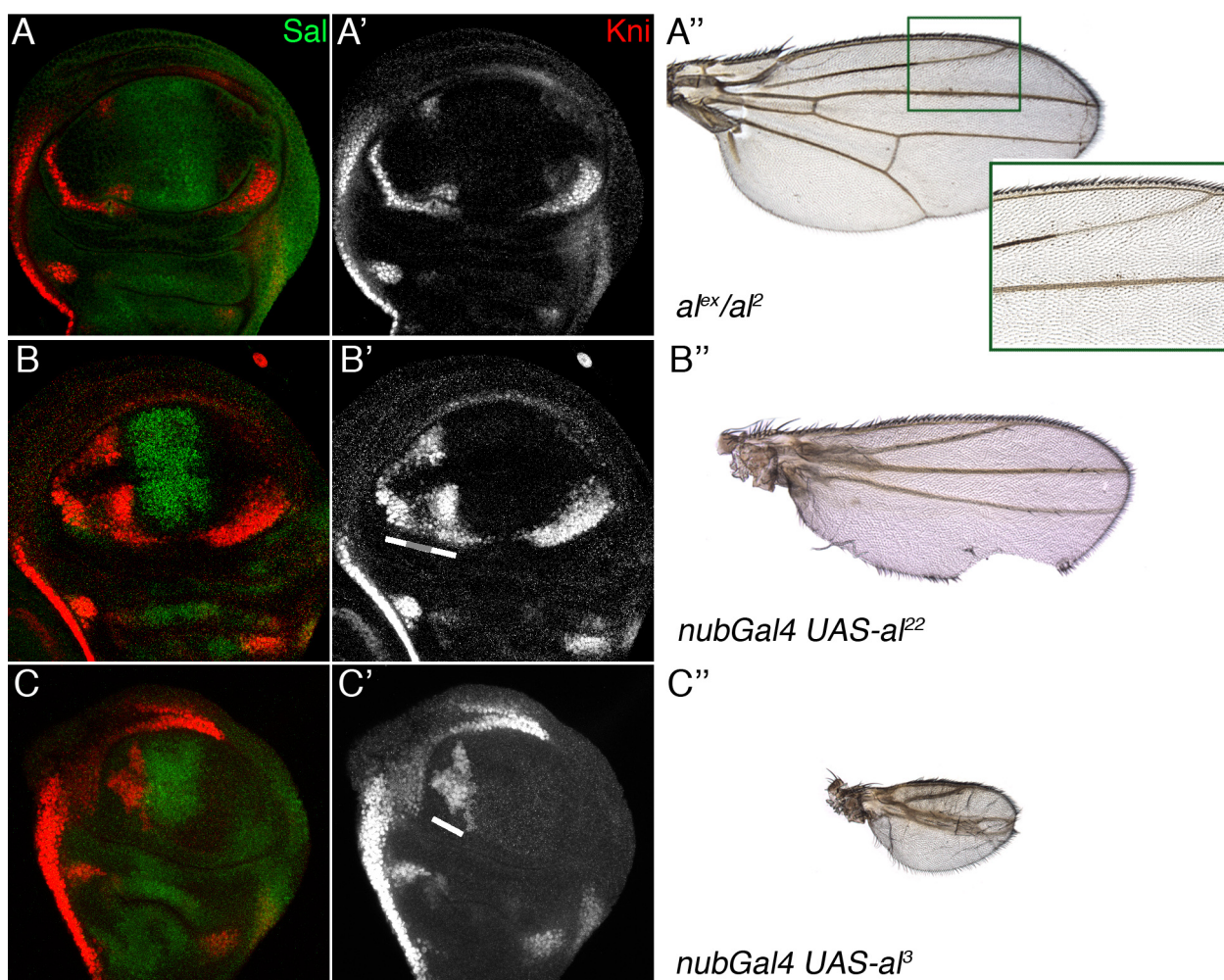


Figura 29. Activación de Kni mediada por AI. (A-C') Discos de ala de tercer estadio larvario mostrando la expresión de Salm (verde) y Kni (rojo en A-C y blanco en A'-C'). (A-A'') Individuos *aI^{ex}/aI²* donde se observa la disminución de Kni en la región presuntiva de L2 (A-A') y pérdida de diferenciación de la vena L2 (A''). (B-B'') Individuos *nubGal4; UAS-aI²²*, en los que se aprecia extensión del dominio de expresión de Kni (barra en A'), desplazamiento hacia anterior de la vena L2 así como desaparición de la vena L5, disminución del tamaño y muescas en el margen del ala (B''). (C-C'') Individuos *nubGal4; UAS-aI³*, donde igualmente encontramos Kni en la parte más anterior del ala (C-C') así como desplazamiento de la vena L2, disminución del tamaño, desaparición de la vena L5, y acercamiento o fusión de las venas L3 y L4 (C'').

región presuntiva de ala. Es de destacar que en condiciones de expresión ectópica de AI en el compartimento posterior se produce la desaparición de la vena L5, lo que indica que AI podría interferir con la expresión de los genes que determinan esta vena (*Iro-C* y *abrupt*).

2.4 Regulación de la ruta JNK en la región central del ala.

Trabajos previos han descrito que en respuesta a una bajada de la expresión de Sal se produce una activación de la ruta JNK en la región central del ala (Figura 30). La ruta JNK está relacionada con procesos vinculados a la supervivencia y migración celular, aunque la actividad JNK no es responsable de la apoptosis observada en discos mutantes para *sal* (Organista y de Celis, 2013). La actividad JNK sí podría ser responsable de las alteraciones

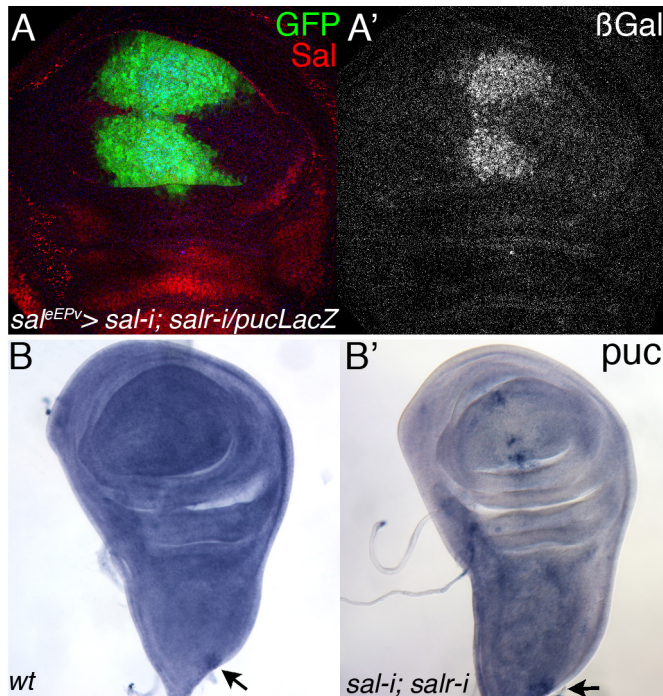


Figura 30. Activación de la ruta JNK en ausencia de Sal. (A-A') Disco de ala de larvas de tercer estadio *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; puc-lacZ/UAS-salr-i* donde se muestra el territorio donde se dirige la expresión de Gal4 (GFP, verde), la bajada de expresión de Salm (rojo) y la activación de la ruta JNK (β-gal, blanco en A'). (B-B') Expresión de *puc* en discos de ala silvestre (B) y *sal^{EPV}-Gal4/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+* (B') revelada mediante hibridación *in situ*, donde encontramos presencia de *puc* en la región central del disco. Las flechas señalan la expresión de *puc* en la región más dorsal del tórax.

de la estructura epitelial observadas en condiciones mutantes para *sal*. La activación de la ruta JNK, de manera general, comienza por la unión de TNF (*egr* en *Drosophila*) a su receptor, desencadenando así una cascada de fosforilaciones (Rios-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013). Esta activación también puede darse de manera independiente a los ligandos en respuesta a señales tales como el estrés mecánico o la pérdida de polaridad celular (Rios-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013).

2.4.1 Estudio de la expresión de *egr* y su respuesta a la falta de Sal.

Un candidato a mediar la activación de la ruta JNK en respuesta a la falta de *sal* es el ligando Egr, el cual presenta un aumento significativo en su expresión en la condición *sal* mutante a T48 (p-valor= $5 \cdot 10^{-5}$). Este gen no se encuentra dentro del listado de genes seleccionados porque su magnitud de cambio es tan sólo de 0,65x (logFC=-0,6) y además no presenta un aumento significativo de su expresión a T24 (p-valor= 0,06).

En discos de ala silvestres no encontramos expresión de *egr*, ni siquiera en la parte más dorsal de la región presuntiva del tórax que es donde se activa la ruta JNK (Figura 31A). En fondo mutante para *sal* se aprecia expresión de *egr* en la región central del ala (Figura 31, flechas en B). Comprobamos que la sonda reconoce a *egr* realizando la hibridación *in situ* en un fondo de sobre-expresión de *egr* (*sal^{EPV}Gal4/+; UAS-egr/+*; Figura 31C). En este caso encontramos además de un claro aumento de la expresión de *egr* daños en el epitelio y una reducción del tamaño de la región central del ala (Figura 31C). Estos defectos se eliminan al sobre-expresar simultáneamente la fosfatasa inhibidora de la ruta *puc*, manteniéndose el aumento de la expresión de *egr* (Figura 31D).

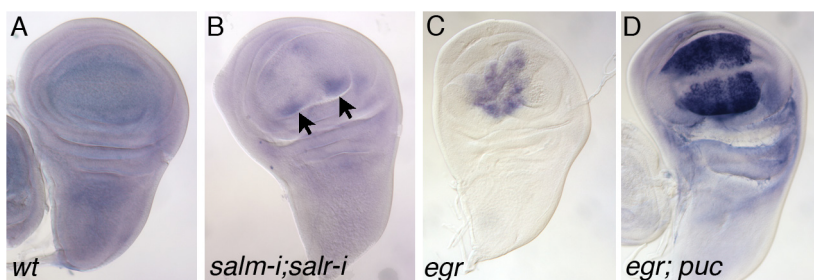


Figura 31. Estudio de la expresión de *egr*. (A-D) Hibridaciones *in situ* con una sonda específica para *egr* en discos de ala de tercer estadio larvario. (A) Genotipo silvestre, donde no apreciamos expresión.

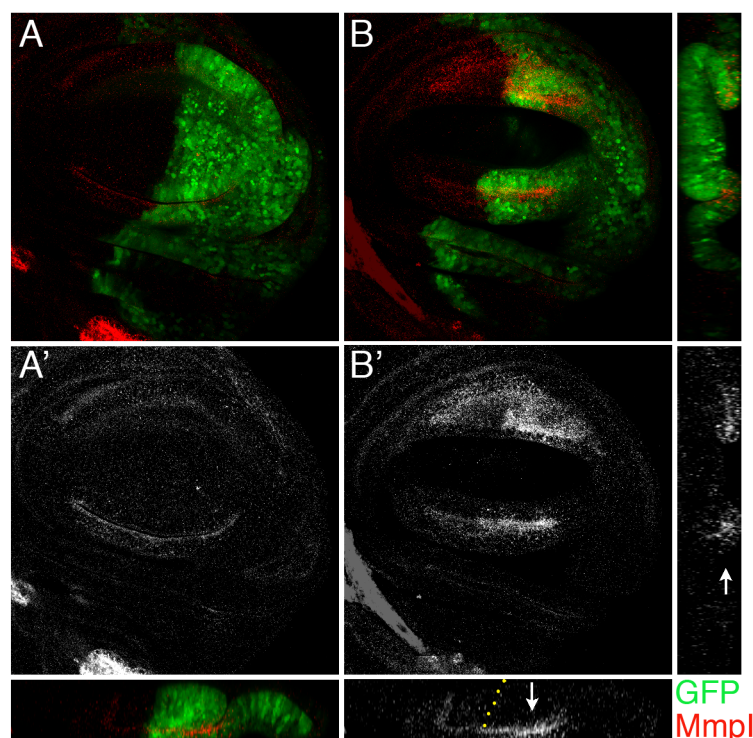
(B) Genotipo *sal^{EPV}-Gal4 /UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*; donde se observa presencia de ARNm de *eiger* (flechas). (C) Genotipo *sal^{EPV}-Gal4; UAS-egr*, donde además de mayor expresión de *egr* encontramos que la región donde dirigimos su expresión esta reducida y malformada. (D) Genotipo *sal^{EPV}-Gal4; UAS-egr/UAS-puc*, donde encontramos un fuerte incremento de la expresión de *egr* en discos con una morfología silvestre.

2.4.2. Papel de Sal en la regulación de la ruta JNK.

A pesar de encontrar expresión ectópica de *egr* en discos mutantes para *sal*, es también posible que la activación de la ruta JNK sea una consecuencia del daño epitelial que encontramos en ausencia de *sal*. Ayudándonos de nuevo del sistema Gal4/Gal80^{TS}, analizamos la expresión de Mmp1, una metaloproteasa diana de la ruta JNK, en discos mutantes para *sal*. En este experimento evitamos el uso de la línea *puc-lacZ* para monitorizar la activación de la ruta JNK, debido a que esta condición es hipomorfa para la fosfatasa *puc*, lo que facilita la activación de la ruta. Tras inducir 24h la expresión de los ARNi para *salm* y *salr* encontramos expresión de Mmp1 (Figura 32). En este caso observamos que el epitelio mantiene una morfología silvestre, por lo que la represión de Sal sobre la ruta JNK precede

Figura 32. Activación de JNK 24h después de la bajada de Sal. (A-B')

Discos de ala de tercer estadio larvario con atenuación de la expresión de *sal* en el territorio posterior (GFP, verde) durante 24h (*en-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; tub-Gal80^{TS}/UAS-salr-i* crecidas durante 24h a 29°C). Se muestra la expresión de Mmp1 (rojo en A-B y blanco A'-B') en dos planos del disco: apical (A-A') y basal (B-B'). Se muestra a la derecha un corte sagital, donde se aprecia la expresión de Mmp1 en la región basal (flecha), y abajo un corte tangencial, donde observamos un incremento de Mmp1 en el compartimento posterior (flecha).



enGal4 tub Gal80^{TS} sal-i salr-i 24h

GFP
Mmp1

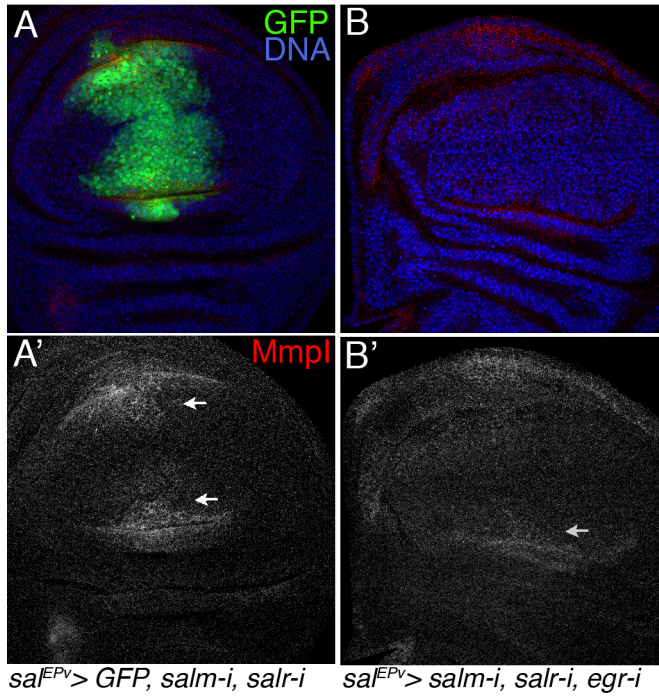


Figura 33. Sal reprime la ruta JNK a través de Egr. Discos de ala de tercer estadio larvario que muestran la activación de JNK (Mmpl, rojo y blanco) en condiciones de atenuación de *sal* (A-A'; *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*) y donde además se disminuye *egr* (B-B'; *sal^{EPV}-Gal4/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*). Se aprecia una clara disminución de la expresión de Mmpl en ausencia de *egr* (flechas, comparar A' con B'). Se muestra en verde (GFP) el territorio de expresión de los ARNi y en azul (ToPro) los núcleos del disco.

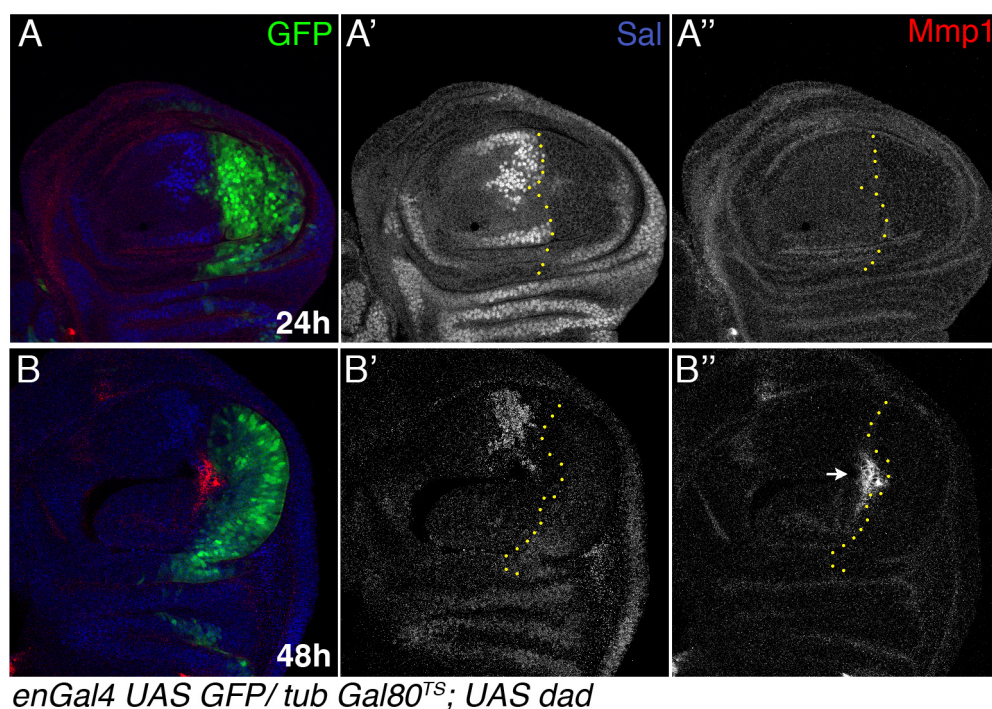
a la aparición de daños epiteliales. Si disminuimos la expresión de *egr* (*UAS-egr-i*) a la vez que reducimos los niveles de *sal* encontramos que la expresión de Mmpl se encuentra reducida (Figura 33, A-A' comparado con B-B').

2.4.3. Activación de la ruta JNK mediada por Dpp.

Nuestros datos muestran que Sal reprime la actividad de la ruta JNK en el centro del ala, con lo que es de esperar que otras señales, como por ejemplo la ruta Dpp, actúen en este mismo territorio activando esta ruta. Para demostrar esta hipótesis, bloqueamos la ruta Dpp en el centro del ala utilizando el sistema Gal4/Gal80^{TS} para sobre-expresar Dad, un inhibidor de la ruta Dpp. Encontramos que a T24 se elimina tanto la expresión de *sal* como la activación de la ruta JNK (Figura 34A-A''). A T48 encontramos que el epitelio del disco está dañado y que Mmpl se expresa en su región basal (Figura 34B-B''). Todos estos resultados son compatibles con que en un primer momento la activación de JNK es promovida por la ruta Dpp, y que Sal, otra diana de esta ruta, impide dicha activación. A tiempos posteriores, la presencia de señalización Dpp ya no sería necesaria para dirigir la activación de la ruta, posiblemente debido a que los daños epiteliales causados por la falta de Sal serían suficientes para promover su activación.

3. Identificación del mecanismo molecular de regulación génica por Sal.

Un aspecto importante pero desconocido de las proteínas Sal es el de sus mecanismos de regulación transcripcional. La identificación de un conjunto de genes que podrían ser regulados por Sal y mediar sus funciones biológicas permiten abordar este aspecto de su función. Con este fin, hemos realizado experimentos de ChIP y una búsqueda de las regiones reguladoras de la expresión de los genes diana de Sal, así como una exploración de otras proteínas reguladoras de la transcripción que participen junto con Sal en la regulación



enGal4 UAS GFP/tub Gal80^{TS}; UAS dad

Figura 34. La ruta Dpp es necesaria para la activación de JNK. Disco de ala de tercer estadio larvario con bloqueo la ruta Dpp en el compartimento posterior (GFP, verde; *en-Gal4 UAS-GFP*; *tub-Gal80^{TS}*/ *UAS-dad*) durante 24h (A-A'') o durante 48h (B-B'') mostrando la expresión de Salm (azul) y Mmp1 (rojo). (A-A'') Observamos cómo en el compartimento posterior se elimina la expresión de Sal (A') y no hay activación de la ruta JNK (A''). (B-B'') Plano del disco más basal, donde se aprecia expresión de Sal en el compartimento anterior pero no así en el posterior (B') y se detecta activación de la ruta JNK (B'', flecha) en el borde A/P (línea punteada amarilla).

de la expresión génica.

3.1 Inmunoprecipitación de cromatina asociada a Salm.

Mediante técnicas de inmunoprecipitación de cromatina sería posible aislar las regiones del ADN que interaccionan con Salm. Es de esperar que estas regiones estén presentes en los genes que varían su expresión en individuos *sal⁻* como consecuencia de una regulación directa. Realizamos experimentos de *ChIP-on-chip* a partir de cromatina aislada de discos de ala en los que se sobre-expresó Salm unido a CFP (Construcción cedida por la Dra. Barrio; Figura 35A-A'). Se utilizó, de manera paralela, anticuerpo anti-GFP (situación experimental) y anti-βgal (situación control) para llevar a cabo la precipitación de la cromatina. Las muestras obtenidas se marcaron y se hibridaron en chips con sondas representativas de la totalidad del genoma de *Drosophila*. Tras el revelado se comprobó que los datos obtenidos pasaban los controles de calidad pertinentes, de forma que en la situación experimental se precipitaba ADN de manera enriquecida respecto a la situación control. Tras un procesamiento informático (ver Materiales y Metodos) se encontraron una gran cantidad de regiones de la cromatina precipitadas con el anticuerpo anti-GFP con respecto a las precipitadas con anti-βGal (p-valor > 0,05). A estas regiones las denominamos picos de unión, y éstos se clasificaron siguiendo diferentes umbrales de confianza (*False Discovery Rate*; FDR25, 10,

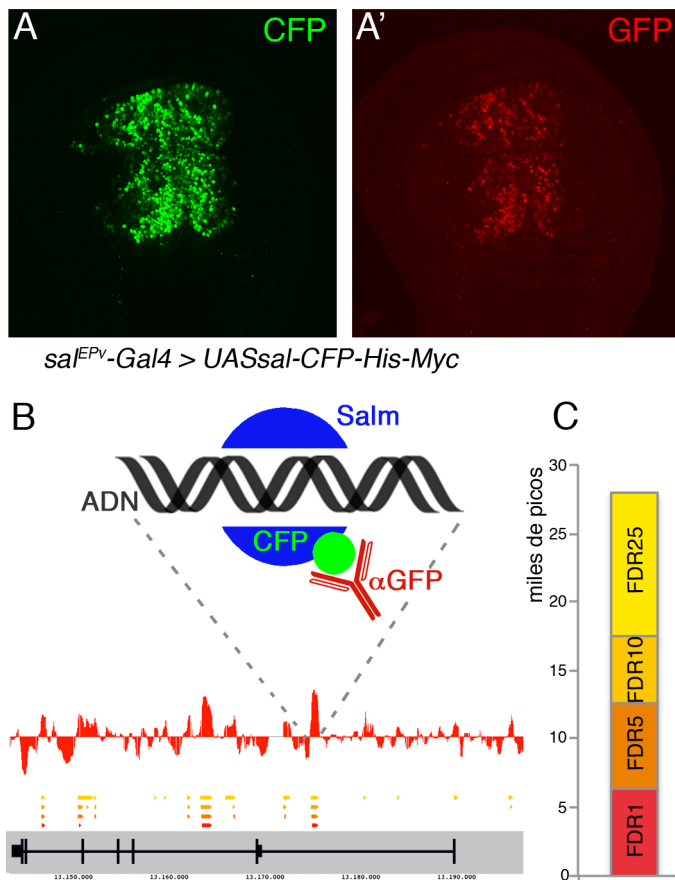


Figura 35. Inmunoprecipitación de cromatina unida a Salm. (A-A') Discos de ala de tercer estadio larvario *sal^{EPv}-Gal4/UAS-salm-CFP-His-Myc* utilizados para llevar a cabo los ensayos de *ChIP-on-chip*, se observa la expresión de la construcción *Salm-CFP-His-Myc* (CFP en A) y cómo el anticuerpo α GFP es capaz de reconocer la etiqueta CFP (A'). (B) Esquema experimental de la precipitación mediante α GFP de la cromatina unida a la construcción *Salm-CFP-His-Myc*. Tras un tratamiento informático podremos localizar los picos de unión en el genoma de *Drosophila*. (C) Número de picos encontrados para los diferentes grados de confianza (FDR1, 5, 10 y 25).

5 y 1). De esta manera encontramos 27.987 picos con FDR25, 17.420 con FDR10, 12.666 con FDR5 y 6.434 con FDR1 (Figura 35C). Debido a que aparecen una gran cantidad de regiones con las que Salm está interaccionando trabajaremos con el conjunto de picos con el umbral de confianza más estricto (FDR1=6.434; Tabla S5).

Observamos que los picos aparecen por todo el genoma, tanto cercanos a genes en los que hemos comprobado que sufren un cambio en respuesta a Sal, como en genes que no. Aun así con los datos obtenidos tratamos de buscar algún motivo compartido entre estas regiones que pudiera participar en la unión de Salm a la cromatina. Para ello utilizamos el software HOMER (*Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment*) (Heinz et al., 2010), y la herramienta *findMotifsGenome.pl*. Para la búsqueda de motivos enriquecidos utilizamos como fondo un conjunto de regiones del genoma de *Drosophila* con un tamaño similar al de los picos que hemos introducido. En esta búsqueda no encontramos ningún motivo que esté enriquecido con respecto del fondo.

3.2 Búsqueda de secuencias que responden a Sal.

También buscamos entre los genes que hemos identificado a ser regulados por Sal la región de ADN que dirige esta expresión y su respuesta a Sal. Una vez identificados estos fragmentos, podremos buscar si en ellos aparecen secuencias comunes. Tomamos como genes objeto de este estudio aquéllos en los que hemos sido capaces de visualizar mediante hibridación *in situ* un cambio de expresión al reducir los niveles de *sal*. Dentro de éstos

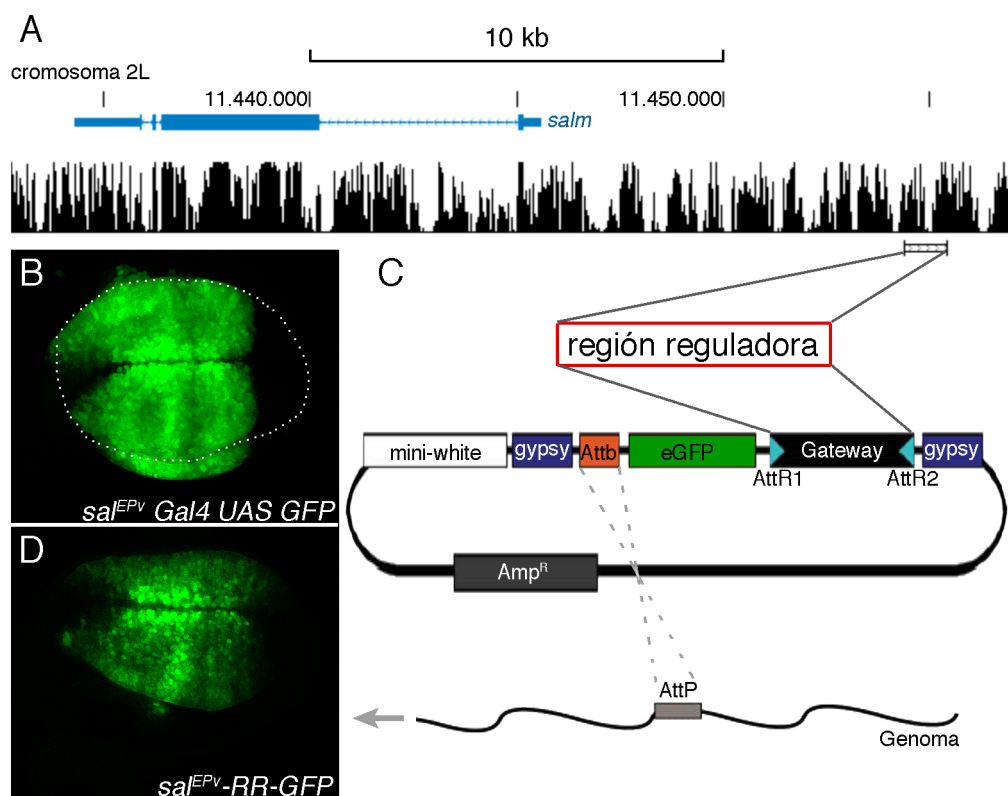


Figura 36. Las construcciones realizadas con el vector pDesteGFP dirigen la expresión de GFP en larvas de *Drosophila*. (A) Representación esquemática del gene *spalt-major* (*salm*) en el brazo cromosómico 2L donde se señala la región *Sal^{EPV}* (Cruz et al., 2009) responsable de su expresión en la región central del ala (B). (C) Representación esquemática del vector pDesteGFP (Boy et al., 2010). (D) Disco de ala de tercer estadio de larvas en las que se ha transformado la construcción *sal^{EPV}-RR-GFP*, que dirige la expresión de GFP en el mismo patrón que *sal^{EPV}-Gal4* (Comparar B con D).

descartamos aquéllos para los que el cambio está mediado por la activación ectópica de la ruta JNK, y aquéllos que presentaban una expresión generalizada que disminuye ante la falta de *sal*. Así reducimos el conjunto de genes a 32 que presentan una activación ectópica en ausencia de *Sal* y 15 que presentan una expresión en un patrón restringido el cual desaparece en la región central del disco de ala en respuesta a la bajada de *Sal* (Tabla 4).

Para llevar a cabo este estudio nos valemos del vector pHPDesteGFP (Boy et al., 2010) (Figura 36C), que nos permite clonar mediante el sistema Gateway potenciadores que dirigen la expresión de *eGFP* como reportero (ver materiales y métodos). Mediante la secuencia *attB* podemos insertar esta construcción de manera dirigida (donde se encuentre la secuencia *attP*), este punto es muy importante ya que permite que comparemos todas las regiones transformadas entre sí al encontrarse en el mismo entorno génico. Para el seguimiento de esta construcción en moscas adultas utilizaremos el gen *mini-white*, que rescata el fenotipo de ojo blanco causado por la mutación *white* (*w*). Como control de que éste es un buen sistema para revelar el funcionamiento de potenciadores, hemos clonado la región *sal^{EPV}* (Barrio y de Celis, 2004) y comprobado que dirige la expresión de *eGFP* en la región central del disco de ala tal y como está descrito (Figura 36). Para elegir qué zona de cada uno de los 47 genes seleccionados clonaremos en el vector pHPDesteGFP, primero

Gen	Símbolo	Expresión	Tamaño	DIRECCIÓN	Trasgén	Resultado
CG5202	<i>escl</i>	U+	205	chr2L 11990741 11990975	+	-/-
CG5096	<i>CG5096</i>	U+	210	chr2L 10384633 10384844	+	-/-
CG17533	<i>GstE8</i>	U+	235	chr2R 14295131 14295365	-	---
CG6013	<i>CG6013</i>	P-	355	chr3R 14856931 14857287	+	-/-
CG5247	<i>lrbp</i>	U+	374	chr3R 7235450 7235850	+	-/+
CG14907	<i>CG14907</i>	N+	400	chr3R 12478018 12478416	-	---
CG3448	<i>CG3448</i>	N+	442	chr3L 9444634 9445077	+	+/-
CG18213	<i>CG18213</i>	N+	500	chr3R 12865850 12866450	+	+/-
CG14121	<i>ver</i>	U+	539	chr3L 12516965 12517550	+	-/+
CG16928	<i>mre11</i>	N+	584	chr2L 11281601 11282199	-	---
CG12843	<i>Tsp42Ei</i>	P-	631	chr2R 2922218 2922819	+	+/-
CG1925	<i>mus205</i>	U+	632	chr2R 10249235 10250050	+	-/-
CG17530	<i>GstE6</i>	N+	660	chr2R 14292880 14293541	+	+/-
CG43103	<i>CG43103</i>	P-	741	chr2R 13027376 13028123	+	-/-
CG6658	<i>Ugt86Di</i>	P+	840	chr3R 6979536 6980376	+	-/+
CG32055	<i>CG32055</i>	P-	910	chr3L 10213235 10214200	+	-/-
CG10916	<i>CG10916</i>	U+	940	chr2R 14060200 14061176	+	-/-
CG6272	<i>CG6272</i>	N+	962	chr3L 11091286 11092286	+	+/-
CG18522	<i>CG18522</i>	N+	987	chr3R 11363010 11364021	+	+/-
CG3008	<i>CG3008</i>	U+	1122	chr2L 4882400 4883600	+	-/+
CG33048	<i>Mocs1</i>	U+	1208	chr3L 11063013 11064222	+	-/-
CG10965	<i>Corp</i>	N+	1225	chrX 8165293 8166514	+	+/-
CG11897	<i>CG11897</i>	U+	1314	chr3R 24982873 24984188	+	-/+
CG10576	<i>CG10576</i>	P-	1526	chr3L 5757542 5759066	-	---
CG32625	<i>CG32625</i>	U+	1809	chrX 13648387 13650197	+	-/-
CG15784	<i>CG15784</i>	P+	1968	chrX 5322712 5324712	+	+/-
CG2909	<i>CG2909</i>	U+	2002	chrX 10218600 10220604	+	-/-
CG1303	<i>agt</i>	U+	2043	chr3R 2485745 2487790	+	-/-
CG8084	<i>ana</i>	P-	2400	chr2R 4951166 4953561	+	+/-
CG32021	<i>CG32021</i>	N+	2692	chr4 929809 931709	+	+/-
CG18657	<i>NetA</i>	P-	2770	chrX 14570986 14572612	+	+/-
CG1273	<i>CG1273</i>	P-	3047	chr3L 4263464 4266789	+	+/-
CG11086	<i>Gadd45</i>	N+	3356	chr2R 3133305 3136658	+	+/-
CG1869	<i>Cht7</i>	P-	3423	chr3L 3106686 3110268	-	---
CG9850	<i>CG9850</i>	P-	3536	chr2R 19682892 19686425	-	---
CG31764	<i>vir-1</i>	P-	3548	chr2L 12420765 12424314	+	-/-
CG30069	<i>CG30069</i>	P-	3600	chr2R 10069700 10073323	+	+/-
CG1342	<i>Spn100A</i>	P-	3604	chr3R 26512701 26516365	-	---
CG7590	<i>scyl</i>	U+	3649	chr3R 22139536 22144080	-	---
CG2999	<i>unc-13</i>	S+	4078	chr4 898378 902456	-	---
CG33970	<i>CG33970</i>	P-	4330	chr3R 22139536 22144080	-	---
CG7201	<i>CG7201</i>	P-	4754	chr3L 8285000 8290000	+	-/-
CG17104	<i>CG17104</i>	P+	5450	chr2L 10671532 10677363	-	---
CG3074	<i>Swim</i>	U+	5800	chr2R 18085358 18091232	-	---
CG18455	<i>Optix</i>	P+	3806	chr2R 3910367 3914173	+	+/-
CG6256	<i>Trim9</i>	P-	8069	chr2L 10539250 10544200	-	---
CG43144	<i>CG43144</i>	N+	---	---	---	---

Tabla 4. Regiones reguladoras estudiadas. Se presentan los genes objeto de este estudio (Genes/ Símbolo), el tipo de expresión que presentan en disco de ala (Expresión), siendo N sin expresión, U generalizada y P con patrón restringido, y su cambio en fondo Sal (Expresión), siendo + un aumento y - una disminución. Se muestra el tamaño de la región seleccionada en pb (Tamaño), las coordenadas a las que corresponde (Dirección), así como si hemos llegado a generar la línea trasgénica (Trasgén; siendo + sí y - no) y la expresión que mostraban dichas líneas (Resultado) donde señalamos si la expresión es igual o parecida a la que encontramos por hibridación *in situ* (+/-) o no (-/-) y si son capaces de responder a Sal (+) o no (-).

llevamos a cabo una búsqueda de regiones reguladoras en la colección de líneas Gal4 de Janelia (Jory et al., 2012). Sólo encontramos regiones que dirigen la expresión en los discos imaginales para *ana*, *optix* y *NetA*, en estos casos clonamos las mismas secuencias (Figura 37).

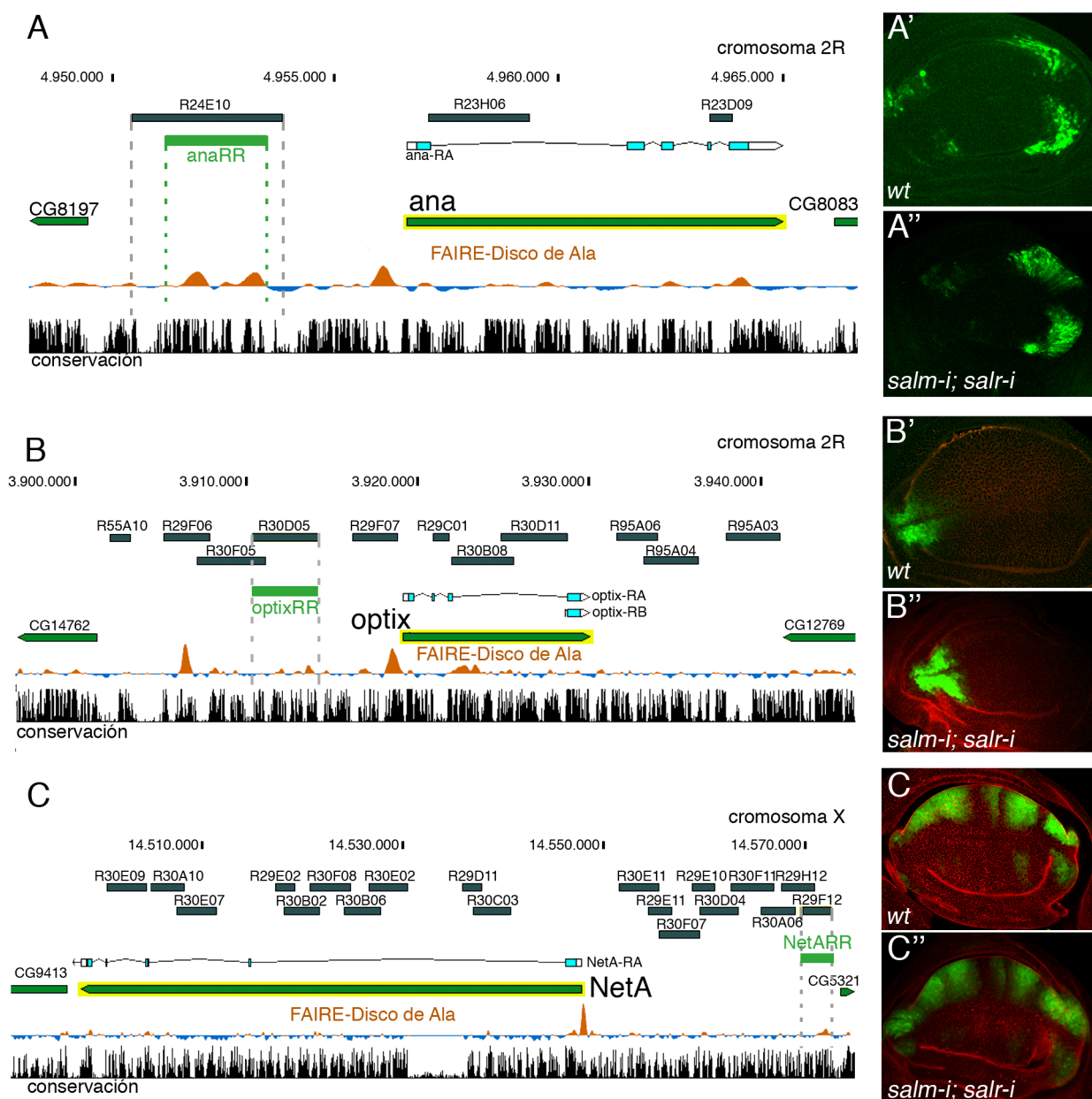


Figura 37. Regiones descritas en la plataforma Janelia y su respuesta a Sal. (A-C) Representación esquemática de los módulos de regulación descritos en la plataforma de Janelia para *ana* (A), *optix* (B) y *NetA* (C). Se destaca con una línea verde la región que hemos transformado en moscas, la conservación entre diferentes especies de Drosophilidos (negro en la parte inferior de cada esquema) y la accesibilidad de la cromatina en el disco de ala (marrón). (A'-C'') Discos de ala de tercer estadio larvario que portan las construcciones *ana-RR-GFP* (A'-A''), *optix-RR-GFP* (B'-B'') y *NetA-RR-GFP*. Observamos cómo dirigen la expresión de GFP (verde A', B' y C') y cómo en ausencia de *sal* (*sal^{EPV}-Gal4/UAS-salm-i; UAS-salr-i/X-RR-GFP*) no varían su expresión (A''-C'').

Para el resto de genes, seleccionamos fragmentos de ADN teniendo en cuenta los siguientes criterios (Figura 38):

- Regiones situadas 5' del gen, o dentro de su región intrónica.
- Regiones que estén conservadas en las diferentes especies de *Drosophila*.
- Regiones que sean accesibles a ADNasas en el disco de ala (McKay y Lieb, 2013).
- Regiones que tengan un tamaño comprendido entre 0,2 y 8 kb.

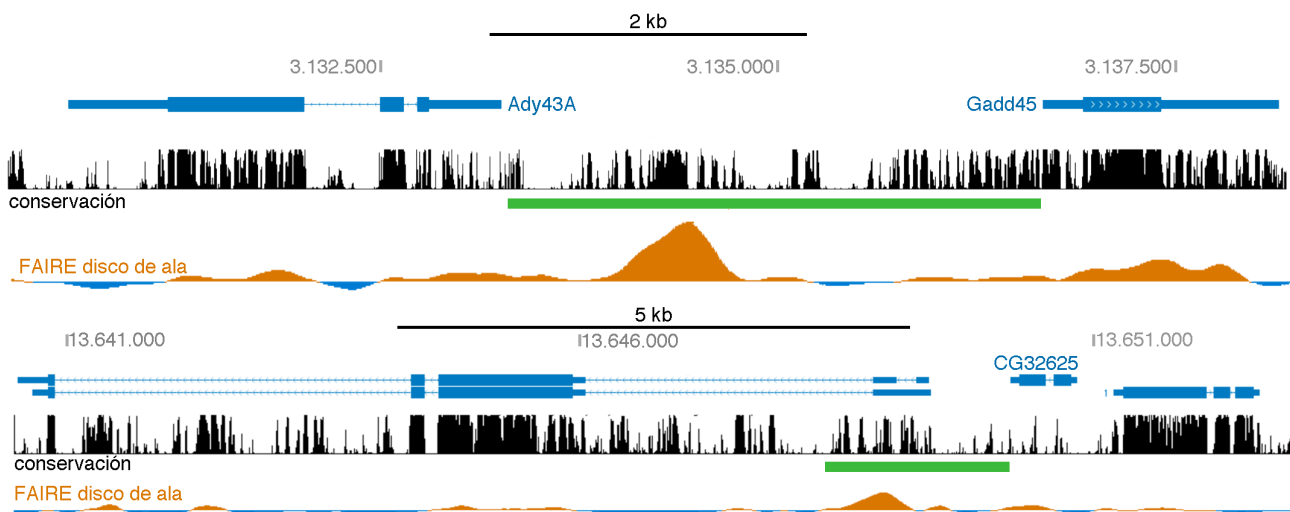


Figura 38. Selección de regiones a clonar. Criterios de selección de posibles regiones reguladoras (barras verdes). Se muestran las regiones codificantes (azul), la conservación entre diferentes especies (negro) y la accesibilidad de la cromatina del disco de ala (FAIRE, marrón).

De esta manera seleccionamos fragmentos de ADN que van desde las 205 pb de *escl* hasta las 8069 de *Trim9* (Tabla 4). De ellos conseguimos moscas transgénicas para 32 de los casos. Cuando analizamos la expresión de eGFP en discos de ala vemos que 18 presentan una expresión parecida a la que encontramos por hibridación *in situ* en situación silvestre. Para 9 de estos casos encontramos que además son capaces de responder a la falta de Sal reproduciendo el resultado observado en el análisis de hibridación *in situ* (Figura 39). Tras este análisis, disponemos de un grupo de regiones de ADN que responden a Sal a partir de las cuales podemos por un lado acotar la región con toda la información necesaria para responder a Sal, y por otro llevar a cabo una búsqueda de motivos comunes entre ellas.

Con el fin de buscar una región mínima que responda a Sal llevamos a cabo un estudio más detallado de la región de 1967 pb adyacente al gen *CG15784* (*CG15784-RR-GFP*), que se expresa de manera ectópica en la situación *sal⁻*. Primero la dividimos en tres regiones de 771, 704 y 496 pb en función de la conservación entre las diferentes especies de *Drosophilidos*, que denominamos *CG15784-A-RR-GFP*, *CG15784-B-RR-GFP* o *CG15784-C-*

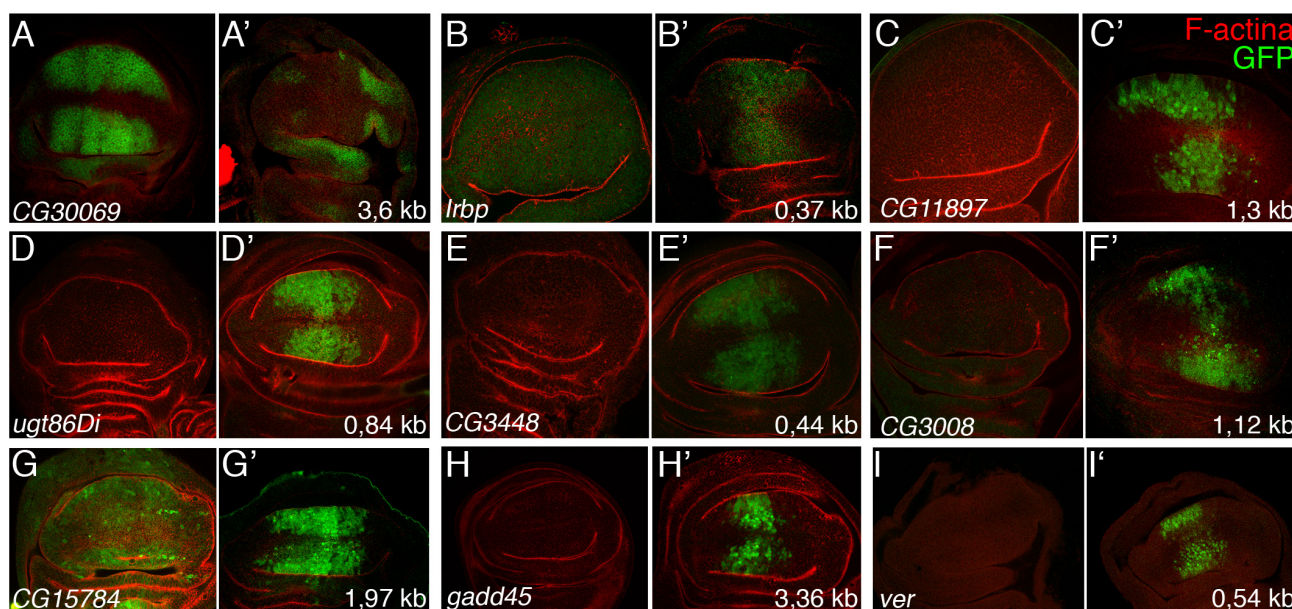


Figura 39. Regiones de ADN que responden a Sal. (A-I') Discos de ala de tercer estadio larvario mostrando actina polimerizada (rojo) y la expresión de GFP dirigida por diferentes zonas reguladoras (verde). (A-I) Discos de larvas que portan fragmentos de ADN de los genes indicados en la parte inferior que son capaces de dirigir la expresión de GFP (verde). (A'-I') Discos de larvas que además del fragmento seleccionado tienen niveles de *sal* disminuidos (*sal^{EPV}-Gal4 UAS-salm-i; UAS-salm-i/X-RR-GFP*). Se señala en la esquina inferior derecha el tamaño de cada uno de los fragmentos seleccionados. En todos los casos observamos un cambio en la expresión de GFP al atenuar la expresión de *sal*.

RR-GFP respectivamente. Al estudiar su expresión tanto en fondo silvestre como en condiciones de bajada de *Sal* observamos que *CG15784-B-RR-GFP* recapitula lo observado para el fragmento completo (Figura 40). Decidimos entonces hacer pequeñas deleciones dentro de esta región, sustrayendo fragmentos que van desde las 195 a las 48 pb cubriendo todo el fragmento clonado, atendiendo también a criterios de conservación. Estas construcciones, que denominamos *CG15784-Δ1-9-RR-lacZ* (Figura 41), permitirían identificar la región con la información necesaria para responder a *Sal*, ya que sería de esperar que la ausencia de esta región cause la expresión ectópica del gen reportero incluso en presencia de *Sal*. Para este análisis nos valemos del plásmido HLz attB (Estella et al., 2008), en el que mediante la digestión por enzimas de restricción se clonan potenciadores que dirigen la expresión de β Gal. Este vector también cuenta con la secuencia attB para dirigir su inserción en moscas y del gen *mini-white* para reconocer por el color de ojos a los adultos que lo portan. Clonamos la región completa para comprobar que al cambiar de vector no se ve alterado este comportamiento.

Cuando analizamos en fondo silvestre cada una de las deleciones realizadas observamos que en ninguna de ellas se expresa de manera ectópica el gen reportero, por lo que deducimos que el dominio de represión por *Sal* debe coincidir con el dominio de activación. Al analizar el comportamiento en fondo *sal⁻* encontramos que las deleciones $\Delta 1$ - $\Delta 3$, $\Delta 5$ y $\Delta 7$ se comportan igual que la región completa. En los casos de $\Delta 4$, $\Delta 6$, $\Delta 8$ y $\Delta 9$ no observamos la activación ectópica al bajar los niveles de *Sal* (Figura 41). Las regiones que encontramos

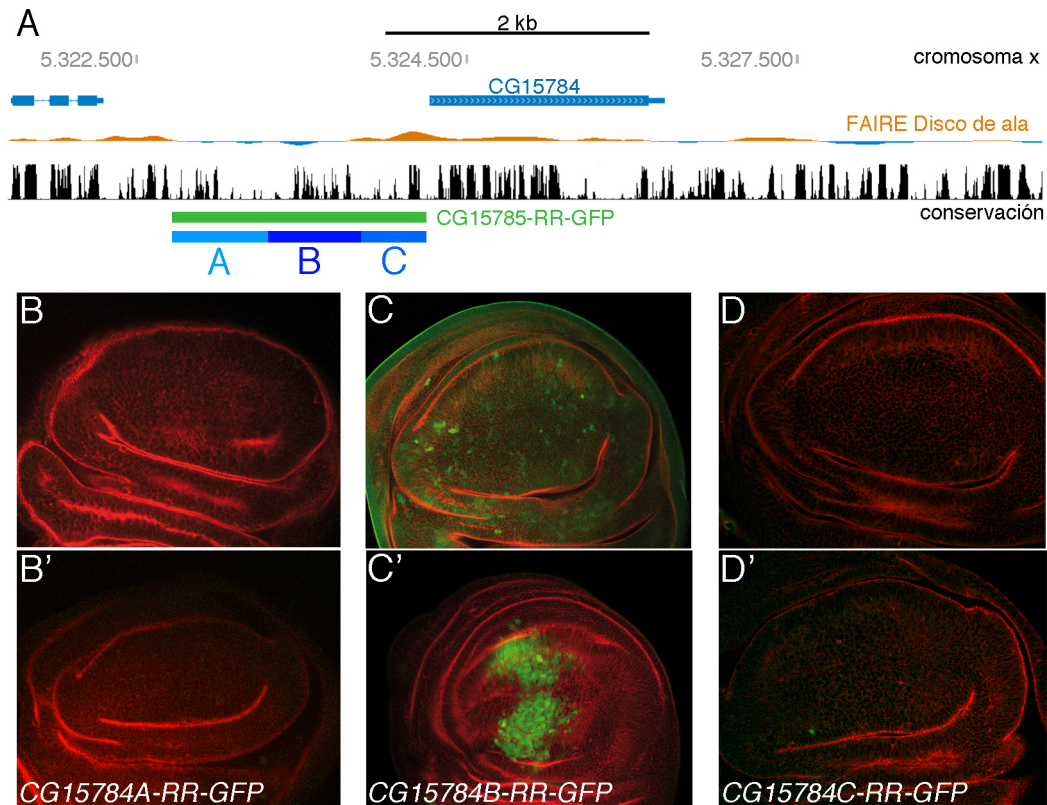


Figura 40. Análisis de la región CG15784-RR-GFP. (A) Esquema del entorno génico del gen *CG15784*, señalando la conservación con otras especies (negro) y la accesibilidad de la cromatina del disco de ala (marrón). En verde se señala la región ya estudiada (*CG15784-RR-GFP*) y en azul los fragmentos en los que dividimos esta región siguiendo criterios de conservación. (B-D') Discos de ala que portan la construcción señalada en la parte inferior donde se muestra F-actina en rojo y GFP en verde. Los discos B-D son de genotipo silvestre y los discos B'-D' de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 UAS-salm-i; UAS-salm-i/X-RR-GFP*. El fragmento B es el responsable de la expresión que encontramos en condiciones de falta de Sal.

como necesarias para que se de la expresión ectópica del gen reportero no comparten secuencias comunes.

A partir del conjunto de 9 secuencias que responden a Sal hicimos también una búsqueda *in silico* de motivos consenso comunes a ellas. Esta búsqueda la hacemos en regiones donde es más probable que se estén uniendo factores de transcripción. La técnica ATAC, mediante el tratamiento con la trasposasa procariota Tn5, permite conocer las regiones de la cromatina que son más accesibles a la interacción con factores de transcripción (Buenrostro et al., 2013). Esta técnica tiene dos ventajas principales frente a otras utilizadas para conocer la apertura de la cromatina (FAIRE o tratamiento con ADNasas): necesita menos cantidad de muestra, lo que hace posible su uso en tejidos silvestres, frente a los cultivos celulares, y tiene un nivel de resolución de 1 base. Además, dentro de las regiones accesibles se pueden distinguir zonas protegidas por la unión de los factores de transcripción (observadas como valles dentro de los picos de apertura).

Seleccionamos dentro de este grupo de secuencias los picos de ATAC que hay descritos para disco imaginal de ala (datos cedidos por el Dr. Gomez-Skarmeta), y de esta ma-

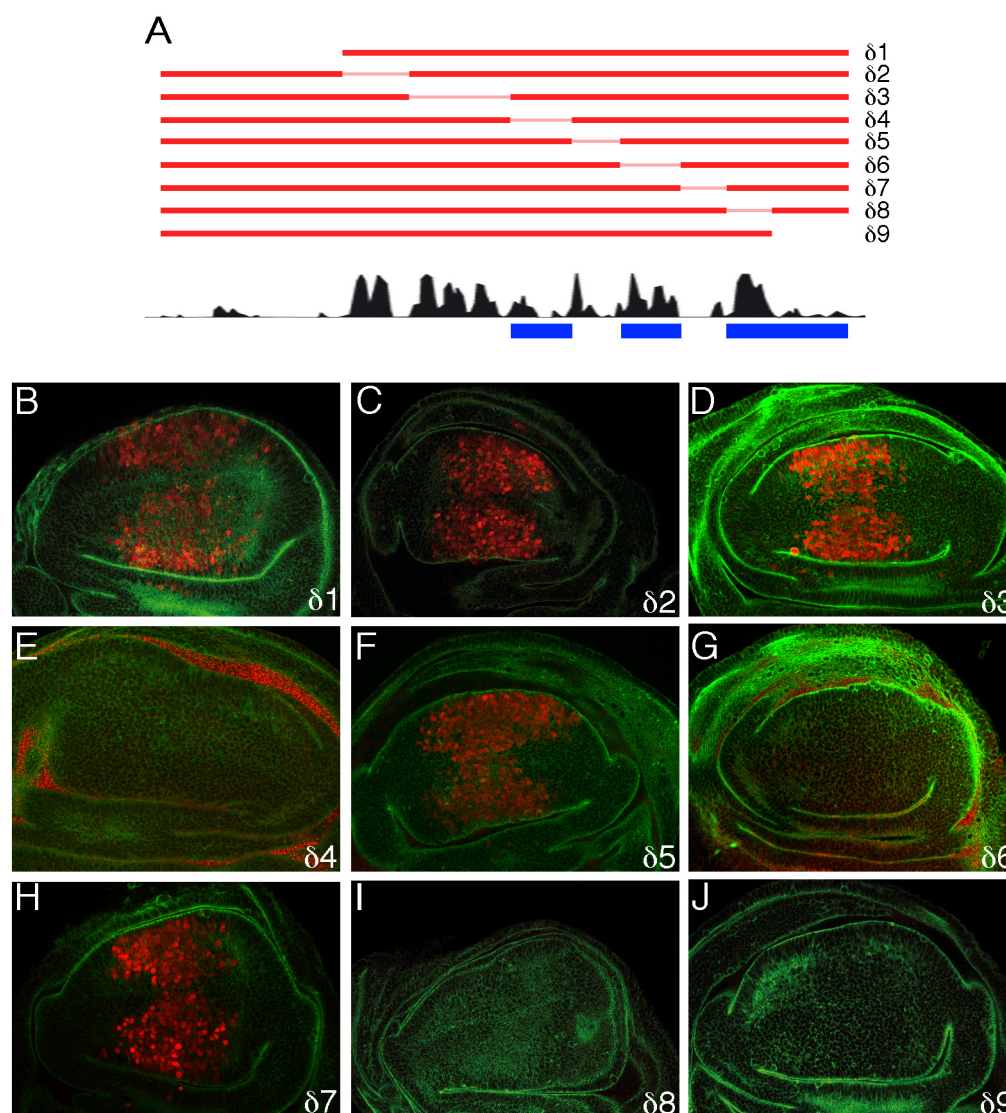


Figura 41. Estudio de la región CG15784B-RR-GFP. (A) Representación esquemática de la región CG15784B, en rojo se representan cada una de las nuevas construcciones en las que se elimina el fragmento indicado, y abajo se muestra la conservación entre las diferentes especies (negro) y los módulos necesarios para que la regulación se dé de manera correcta (azul). (B-J) Discos de ala de tercer estadio con niveles reducidos de *sal* y que portan las construcciones con las delecciones señaladas en la esquina inferior derecha (*sal^{EPV}-Gal4 UAS-salm-i; UAS-salm-i/CG15784- δ X-lacZ*) (expresión en rojo). Identificamos 4 fragmentos necesarios para que se dé activación ectópica en ausencia de *sal*.

nera subdividimos las 9 regiones en 25 fragmentos. Analizamos si entre ellos existe algún motivo que esté enriquecido con respecto a los picos de ATAC que encontramos en el resto del genoma. Mediante el software HOMER encontramos 2 motivos que aparecen de manera enriquecida en nuestros fragmentos (Figura 42). Observamos que estos motivos son ricos en AT al igual que lo descrito anteriormente para Salr (Barrio et al., 1996). Para buscar si estos motivos aparecen en la región adyacente a los genes que hemos descrito como susceptibles de ser regulados por Sal establecemos una región reguladora potencial para cada uno de éstos que denominamos región extendida. Esta región comprende desde el final del gen situado 5' hasta el inicio del siguiente gen localizado 3'. Para realizar esta búsqueda distinguimos entre los genes activados (Sal⁻, 147 genes), reprimidos (Sal⁺, 139 genes),

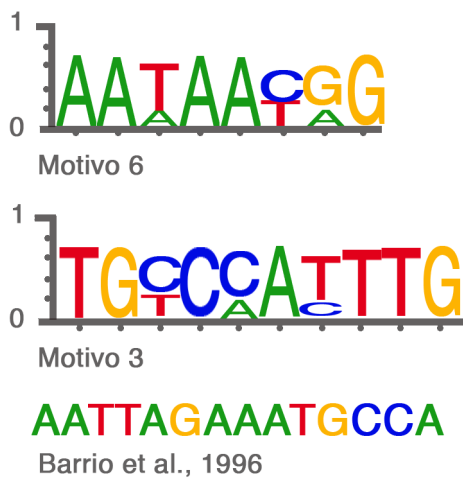


Figura 42. Motivos enriquecidos en las regiones de ADN con respuesta a Sal. Logo de los 2 motivos enriquecidos y secuencia del ya descrito para Salr (Barrio et al., 1996).

mejores candidatos a ser activados (SBC–, 33 genes) o reprimidos (SBC+, 32 genes). También buscamos estos motivos en la región extendida de otros genes que no están dentro de este estudio, utilizando estos datos como control. No encontramos que ninguno de los dos motivos aparezca de manera enriquecida en

los genes regulados por Sal respecto del listado control.

3.3 Modificaciones epigenéticas mediadas por Sal.

Se ha descrito tanto para Sal de *Drosophila* como para Sall1 de vertebrados que interaccionan con heterocromatina (Sanchez et al., 2011; Netzer et al., 2001), además para Sall1 se ha visto que un péptido de 12 aminoácidos presente en la región N-terminal es fundamental para interaccionar con el complejo remodelador de la cromatina NuRD y llevar a cabo su función represora (Lauberth y Rauchman, 2006). Aunque este péptido no está conservado en sus ortólogos de *Drosophila*, es aún posible que la actividad represora que encontramos para Sal se lleve a cabo de manera similar.

3.3.1 Búsqueda de marcas epigenéticas en los genes diana de Sal.

Como análisis previo decidimos buscar si los genes que tomamos como candidatos a ser regulados por Sal están enriquecidos en alguna marca epigenética concreta. Para ello utilizamos los datos publicados por el laboratorio de Karpen G. en la plataforma ModEncode (Celniker et al., 2009), en los que, a partir de células en cultivos de discos mesotorácicos dorsales (CME-W1-C1.8⁺), identifican mediante técnicas de *ChIP-on-chip* cromatina con las siguientes marcas:

H4K16ac: marca parecida a H3K27me3, aparecen en los PRE (*polycomb response elements*) y relacionada con el mecanismo de compensación de dosis (Gelbart et al., 2009).

H4K8ac: asociada a los sitios de inicio de la transcripción (TSS) (Wang et al., 2008).

H3K36me1: asociada a genes activos (Morris et al., 2005).

H3K36m3: relacionada con la activación génica aunque no se encuentra frecuentemente asociada a los promotores (Morris et al., 2005).

H3K18ac: enriquecida en los TSS de genes activos (Wang et al., 2008).

H3K9ac: sobre todo aparece en telómeros (Vaquero-Sedas et al., 2012).

H3K9me2: asociada a heterocromatina y silenciamiento génico (Ebert et al., 2006).

H3K9me3: asociada también a heterocromatina y silenciamiento génico (Ebert et al., 2006).

Buscamos si alguna de estas marcas se encuentra enriquecida en la región extendida de los genes *Sal*⁺, *Sal*⁻, *SBC*⁺ y *SBC*⁻, y encontramos que para los genes activados (*Sal*⁻ y *SBC*⁻) no aparece ninguna marca enriquecida con un p-valor significativo. En cambio para los genes reprimidos observamos que hay un enriquecimiento en la marca típica de heterocromatina H3K9me3 con un p-valor < 0,001 apareciendo en un 8,76% de los genes *Sal*⁺ y en un 12,79% de los *SBC*⁺ en comparación con el 3,09% que hay en el genoma. Estos datos concuerdan con la represión que observamos de estos genes así como con la interacción de *Sal* con la heterocromatina. Para el grupo de *SBC*⁺ también encontramos, aunque con p-valores más altos, enriquecimiento para H3K36me3 (31,92% frente 19,61% en el genoma; p-valor < 0,01) relacionada con la activación génica, para H4K16ac (28,48% frente a 17,74% del genoma; p-valor < 0,025) en general asociada a PRE y para H3K18ac enriquecida en los TSS (17,95% frente a 10,4%; p-valor < 0,025).

3.3.2 Análisis genético de la interacción de *Sal* con proteínas remodeladoras de la cromatina.

Para realizar una búsqueda de cofactores con los que *Sal* podría llevar a cabo la regulación de la transcripción realizamos un estudio de interacciones genéticas entre condiciones de ganancia de expresión de *Sal* y de falta de función de diferentes reguladores transcripcionales. En estas combinaciones buscamos revertir los fenotipos que causa la expresión ectópica de *Salm* mediante la atenuación en la expresión de alguno de los componentes de la maquinaria de remodelación de la cromatina, cuya función podría ser requerida para la actividad de *Sal*. Previamente llevamos a cabo análisis con diferentes líneas *Gal4* para dirigir la expresión de *Salm* buscando una combinación en la que el fenotipo del ala esté modificado de manera suficiente como para poder visualizar cambios. De esta manera

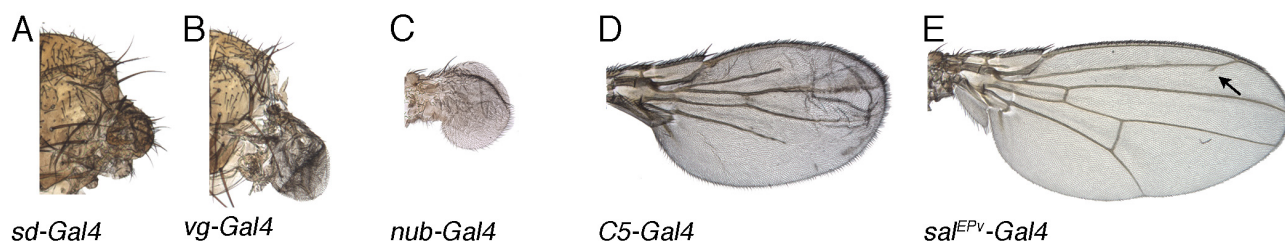


Figura 43. Análisis de líneas *Gal4* para dirigir la expresión de *Salm*. Alas con expresión ectópica (A-D) y sobre-expresión (E) de *Salm*. Se indica la línea *Gal4* utilizada debajo de cada ala.

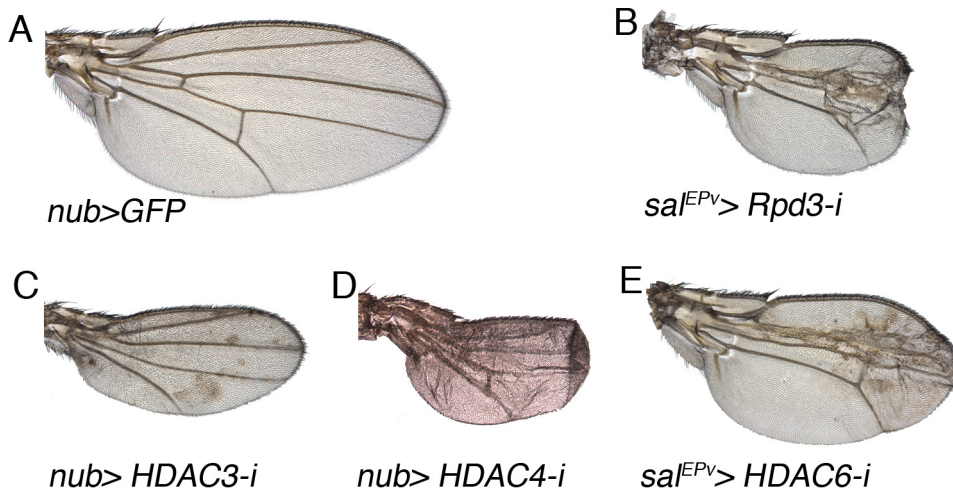


Figura 44. Requerimiento de Histona desacetilasas en el desarrollo del ala. (B-E) Alas resultantes de la expresión de ARNi dirigido contra las Histona desacetilasas indicadas en la parte inferior. Encontramos que la reducción en la expresión de las Histonas desacetilasas producen grandes defectos en el desarrollo de las alas; comparadas con alas de genotipo silvestre (A); HDAC11 presenta letalidad y no se muestra.

dirigimos la expresión de *UAS-salm^{14B}* con 5 líneas: *sd-Gal4*, *vg-Gal4*, *nub-Gal4*, *C5-Gal4* y *sal^{EPv}-Gal4* (Figura 43), observamos cómo en los 3 primeros casos las alas tienen reducciones de tamaño muy pronunciadas y no se distingue el patrón de venas (Figura 43A-C). En combinación con la línea *C5-Gal4* observamos fenotipos en el ala menos acusados que permiten visualizar cambios en el patrón de venas (Figura 43D). Es de destacar que la sobre-expresión de Salm en su dominio normal de expresión (*sal^{EPv}-Gal4*) sólo causa la formación de pequeñas venas ectópicas (Figura 43E). Tras estos resultados decidimos realizar las combinaciones genéticas en individuos de genotipo *UAS-dicer2; C5-Gal4 UAS-salm^{14b}/UAS-ARNi*

Disponemos de líneas ARNi para el conjunto de Histonas deacetilasas descritas en *Drosophila*: *Rpd3* (CG7471), *HDAC3* (CG2128), *HDAC4* (CG1770), *HDAC6* (CG6170) y *HDAC11* (CG31119), así como para la sirtuina *Sir2* (CG5216). Observamos que estas proteínas son necesarias para el desarrollo del ala, ya que cuando dirigimos la expresión de estos ARNi con la línea *nub-Gal4* o *sal^{EPv}-Gal4* observamos defectos como son la letalidad en estadio pupal (*Rpd3*, *HDAC6* y *HDAC11*), grandes reducciones de tamaño (*HDAC3*) o modificaciones del tamaño y patrón de venas (*Rpd3* y *HDAC4*) (Figura 44, Tabla 5). La reducción de *Sir2* no modifica el fenotipo del ala. Sin embargo, en las combinaciones con *C5-Gal4* tan sólo la reducción de *Rpd3* y *HDAC4* modifican el fenotipo del ala, causando la formación de venas ectópicas y cambios en el tamaño y patrón, respectivamente (Figura 45B-C). En combinación con la sobre-expresión de Sal no encontramos casos en los que la bajada de expresión de estas proteínas reduzca el fenotipo que causa el exceso de Salm. Por el contrario, los ARNi contra *Rpd3*, *HDAC6* y *Sir2* agravan este fenotipo (Figura 46B-D y Tabla 5).

También disponemos de líneas ARNi contra otros componentes de complejos remodeladores de la cromatina, entre los que están diferentes cofactores del complejo Sin3A que

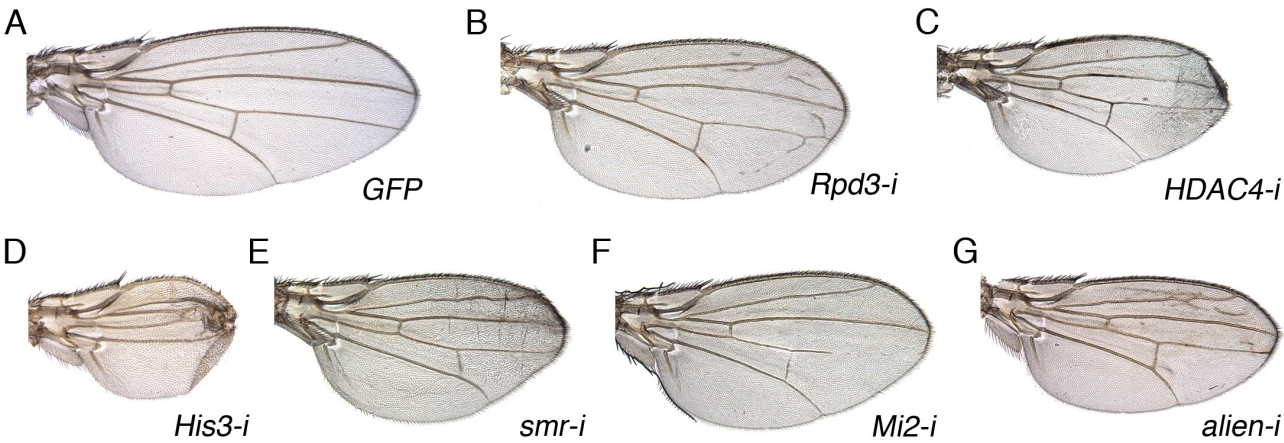


Figura 45. Componentes de la maquinaria remodeladora de cromatina que alteran el fenotipo del ala en condiciones débiles de bajada de expresión. Alas en las que se dirige la expresión del ARNi indicado en la parte inferior en moscas de genotipo *UAS-dicer2;C5-Gal4 UAS-lacZ./+*.

interaccionan con la desacetilasa Rpd3, así como otras proteínas que se han descrito como cofactores de la maquinaria de remodelación de la cromatina. Dentro de los componentes del complejo Sin3A (Tabla 5) encontramos que la atenuación de Caf1-55, una proteína de

Gen	Símbolo	nub//sal	C5	C5>Salm
Desacetilasas				
CG7471	<i>Rpd3-HDAC1</i>	PL/nW // sS-P	V+	INT
CG2128	<i>HDAC3</i>	sS	+	NR
CG1770	<i>HDAC4</i>	S-P	S-P	NR
CG6170	<i>HDAC6</i>	EPL // S-P	+	INT
CG31119	<i>HDAC11</i>	LP	+	NR
Sirtuina				
CG5216	<i>Sir2</i>	+	+	INT
Componentes Complejo Sin3A				
CG11006	<i>Sap130</i>	PL/V-	+	Rp
CG15356	<i>EMSY</i>	nW	+	Rp
CG4236	<i>Caf1-55</i>	sS-P / S-P	+	Rp
CG4400	<i>Brms1</i>	EPL	+	NR
CG4756	<i>Sap30</i>	sF	+	NR
CG7379	<i>CG7379</i>	S-P	+	NR
CG8815	<i>Sin3A</i>	sS	+	NR
Otros Componentes				
CG10042	<i>MBD-R2</i>	EPL/nW // sS-P	+	NR
CG1064	<i>Snr1</i>	+	+	NR
CG12153	<i>Hira</i>	S	+	NR
CG1244	<i>MEP-1</i>	wS-P	+	R
CG14220	<i>CG14220</i>	ssS/V-	+	NR
CG2244	<i>MTA1-like</i>	S	+	NR
CG31613	<i>His3</i>	nW // sS-P	S-P	INT
CG32067	<i>simj</i>	PL	+	NR
CG4013	<i>Smr</i>	PL/nW	S	INT
CG8103	<i>Mi-2</i>	S/V-	S-P	INT
CG8208	<i>MBD-like</i>	sF	+	NR
CG9556	<i>alien</i>	PL/sF/sS/V+	S-P	INT

Tabla 5. Interacción de Salm con componentes de la maquinaria remodeladora de la cromatina. Se muestran los genes con los que se ha llevado a cabo el estudio (Gen, Símbolo), el fenotipo de las alas de las combinaciones *UASdicer; nubG4 RNAi; UASdicer; sal^{EPv}G4 RNAi* (nub//sal) y *UASdicer; C5G4 UAS lacZ RNAi* (C5) siendo: +, silvestre; S, tamaño reducido; F, ala arrugada; S-P, defectos en tamaño y formación del patrón; V, defectos en las venas (V+, formación ectópica, V-, falta parcial); nW, ausencia de ala y L, letalidad (PL, letalidad pupal y EPL, para pupa temprana) se añadió “s” o “w” delante para indicar si es una modificación más fuerte o débil respectivamente. Por último se muestra si la reducción de alguno de estos genes rescata el fenotipo causado por la expresión ectópica de Salm (C5>Salm), siendo NR, ausencia de rescate, INT, una interacción en la que se agrava el fenotipo de Salm, Rp, Rescate parcial y R rescate.

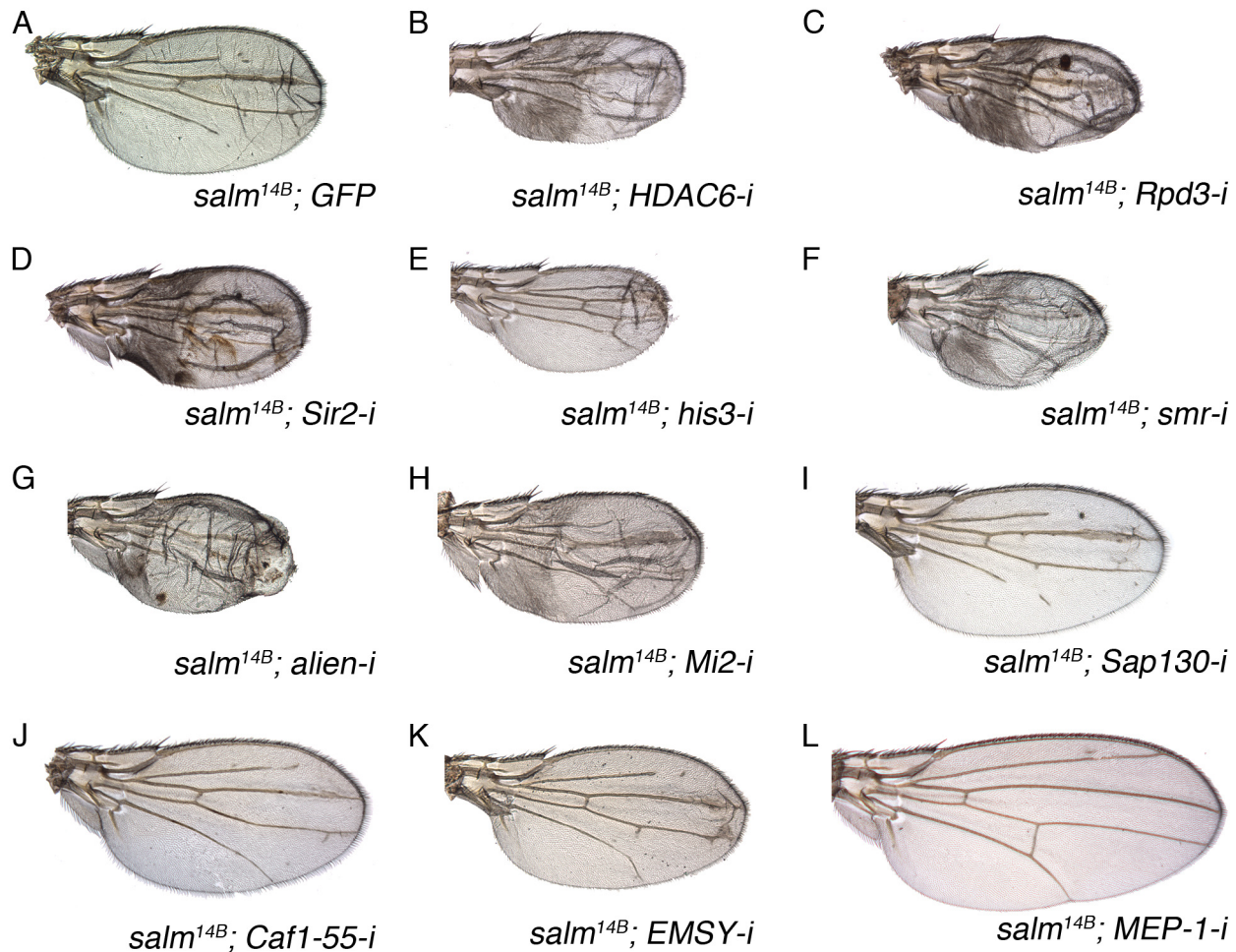


Figura 46. Interacción genética entre componentes de la maquinaria de remodelación de la cromatina y Salm. Alas donde se ha dirigido la expresión de las construcciones indicadas en la parte inferior a todo el territorio del ala (*UAS-dicer2; C5-Gal4*). (B-H) Interacciones que agravan el fenotipo de la sobre-expresión de *salm*, comparadas con A. (I-L) Interacciones que reducen el fenotipo de expresión ectópica de *salm*, comparadas con A.

unión a nucleosomas y desacetilasas, es capaz de revertir parte del fenotipo de las alas con expresión ectópica de Salm (Figura 46J). Un resultado similar se observó en el caso de Sap130 (proteína asociada a Sin3a) y EMSY (Figura 46I y K). La falta de expresión de estos genes en combinación con *C5-Gal4* no afecta al desarrollo del ala (Tabla 5), aunque una reducción mayor en su expresión mediante la línea *nub-Gal4* produce una reducción del tamaño y alteración del patrón en el caso de Caf1-55 y la falta de venas en el caso de Sap130 (Tabla 5)

Finalmente, hemos estudiado en las mismas combinaciones genéticas un total de 11 genes relacionados con la conformación de la cromatina (Histona 3; *CG31513*), o componentes de otros complejos reguladores como NuRD (Tabla 5). Al igual que ocurre para el resto de genes que hemos testado, la bajada de su expresión en combinación con *C5-Gal4*, de manera general, no causa alteraciones en las alas. Tan sólo hemos observado fenotipos mutantes en los casos de la His3, donde apreciamos modificaciones en el tamaño y la for-

mación del patrón, Smarter (Smr), que presenta reducción del tamaño, Mi-2, donde encontramos ausencia de algunas venas, y Alien, que causa aparición de venas ectópicas (Figura 45D-G). En las combinaciones entre estas líneas y la expresión ectópica de Sal encontramos que la atenuación de Smr y Alien agravan el fenotipo del ala *C5-Gal4 UAS-salm^{14b}*, y que la atenuación de MEP-1, que por sí sola no causa ninguna modificación del fenotipo del ala, es capaz de eliminar los efectos de la expresión ectópica de Salm (Figura 46L; Tabla 5). MEP-1 forma parte del complejo NuRD, siendo necesaria para la interacción de algunas proteínas con este complejo (Reddy et al., 2010).

3.3.3. Estudio de la interacción directa entre Salm y Sir2

En el análisis genético observamos que entre Sir2 y Salm existe una relación, aunque contraria a la esperada. Además, estudios previos han descrito que la inhibición de las Sirtuinas disminuye la represión mediada por Sal (Sanchez et al., 2010). Así, mediante técnicas de co-inmunoprecipitación buscamos si la proteína Salm y la sirtulina Sir2 interactúan y forman parte de un mismo complejo. Este estudio lo hemos llevado a cabo a partir de un lisado de embriones silvestres en el que comprobamos mediante inmunodetección en membrana que detectamos las proteínas endógenas (Figura 47). Mediante anticuerpos específicos precipitamos la proteína Sir2 y junto con ella las proteínas con las que forma complejos, y, tras una electroforesis en SDS y transferencia en membrana de dicho inmunoprecipitado, revelamos la presencia de Salm mediante inmunodetección (Figura 47). De esta manera observamos cómo al menos durante el estadio embrionario Salm y Sir2 forman parte de un mismo complejo proteico.

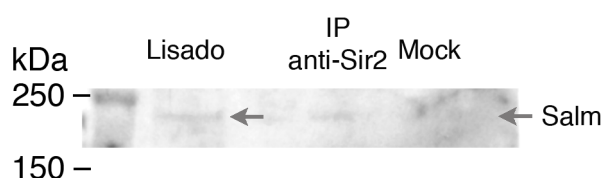


Figura 47. Sal y Sir2 forman parte de un mismo complejo. Inmunodetección con anticuerpo específico para Salm donde encontramos presencia de la proteína tanto en el lisado de embriones como en la muestra precipitada con un anticuerpo específico para Sir2. Esta banda no se detecta en el control negativo (Mock), lo que indica que Sir2 y Salm forman parte de un mismo complejo.

DISCUSIÓN

Las proteínas Sal son factores de transcripción conservados evolutivamente con expresión en patrones espaciales específicos de tejido o tipo celular. En este trabajo nos hemos centrado en su papel durante el desarrollo del ala de *Drosophila*, donde la transcripción de los genes *sal* es promovida por la señalización de la ruta Dpp (de Celis et al., 1996). Aunque trabajos previos han descrito que las proteínas Sal median parte de las funciones de Dpp en este territorio (Organista y de Celis, 2013), se desconoce a través de qué genes realizan estas funciones. En esta tesis hemos realizado una búsqueda de genes regulados por estos factores de transcripción y un estudio de sus requerimientos. De manera complementaria y para entender cómo Sal regula su transcripción, hemos identificado regiones de ADN que responden a Sal en las proximidades de dichos genes, y hemos estudiado diferentes cofactores que podrían requerirse junto con Sal para la regulación de la expresión.

Búsqueda de genes diana de las proteínas Sal

Para realizar la búsqueda de genes regulados por Sal partimos de la premisa de que su expresión cambiará en respuesta a una reducción en los niveles de Sal. Además, esperamos que sus dominios de expresión tengan algún tipo de relación con el patrón de expresión de Sal en el disco de ala, ya sea por coincidir en el mismo territorio, para genes activados, o por restringirse a dominios complementarios, para genes reprimidos. El abordaje experimental que utilizamos nos ha permitido distinguir cambios de expresión a distintos tiempos desde que se reducen los niveles de proteínas Sal (T24 y T48), minimizando la identificación de genes cuya expresión cambie de manera indirecta en respuesta a la falta de Sal. Como era de esperar observamos un mayor número de genes con un cambio significativo a T48 (1488 frente a 686 a T24), y además encontramos casos de genes regulados de manera indirecta por la ruta JNK que fundamentalmente cambian a T48.

Encontramos que un gran número de genes presentan un cambio significativo en sus niveles de expresión, lo que sugiere que las proteínas Sal tienen efectos de gran envergadura sobre la transcripción de las células de la región central del ala. Reducimos el grupo de genes a estudiar utilizando como criterio la magnitud de su cambio (al menos 2X), y a este

conjunto añadimos 95 genes descritos en Organista (2012). Este conjunto de 286 genes fue denominado “genes candidatos a ser dianas de Sal”. Este grupo incluye tanto genes que podrían ser activados por Sal (Sal⁻, n=147), como candidatos a ser reprimidos por Sal (Sal⁺, n=139). La presencia de genes activados y reprimidos por Sal sugiere que esta proteína puede funcionar tanto activando como reprimiendo la transcripción, funciones que también llevan a cabo sus ortólogos en vertebrados (Li et al., 2004; Yamashita et al., 2007; Yang et al., 2007).

Si comparamos los genes seleccionados con los datos de diferentes experimentos de microarrays relacionados con *sal* o realizados en el disco imaginal de ala, observamos que de manera general existen pocas coincidencias; por ejemplo de los 146 genes descritos con expresión diferencial entre la región presuntiva de ala y notum (Butler et al., 2003) encontramos sólo 13 coincidencias donde la mayoría (n=8) los hemos clasificado como genes Sal⁻ y que se expresan preferencialmente en la región de ala. Comparando nuestra selección de 286 genes con un total de 4954 cuya expresión se modifica en embriones silvestres respecto a embriones mutantes para *sal* (Ferreiro et al., 2012) es de destacar que sólo 10 genes coinciden, lo que sugiere que Sal controlaría diferentes grupos de genes dependiendo del momento y el tejido en el que lleve a cabo su función.

Para realizar el estudio cualitativo de la expresión *in situ* de los genes seleccionados en el disco imaginal de ala, decidimos prescindir de aquellos que sólo presentaban un cambio a T48, ya que estos cambios podrían ser indirectos. De los genes analizados, encontramos que un 14% de genes Sal⁻ presentan un patrón de expresión restringida en el disco de ala, que en la mayoría de los casos, como cabría de esperar, solapa con el territorio de expresión de *sal*. Entre estos casos la expresión puede darse en las intervenas (*CG12843*, *CG6013* y *CG30069*) o en las venas (*CG1273*, *CG33970* y *CG9850*). Para los genes Sal⁺ con expresión restringida (10%), sólo *CG18455* (*optix*) presenta un patrón complementario al de *sal*. En la mayoría de los casos analizados encontramos patrones expresión generalizada por todo el disco (U; 84% en Sal⁻ y 69% en Sal⁺), o casos de genes que no se expresan en el disco de ala (N; 2% en Sal⁻ y 21% en Sal⁺). Nos encontramos por tanto con un escenario que difiere bastante del esperado, ya que la mayoría de genes estudiados no se expresan en un patrón espacial relacionado con el de *sal*.

Al estudiar los efectos de la falta de Sal sobre la expresión *in situ* de estos genes encontramos que en un 78% de los casos Sal⁻ disminuye la expresión en la región central del ala, confirmando lo detectado en los experimentos de microarray. En el 22% restante, la expresión no cambia en discos mutantes para *sal* respecto a los controles. De los genes Sal⁻ con patrón restringido cuya expresión no cambia (n=4), *CG3649* se expresa fuera del territorio *sal* y *CG43079* en grupos de pocas células. Resultaron más interesantes los casos de los genes *CG17278* y *CG32372* que sí se expresan en la región central del ala. Sin embargo, experimentos adicionales indicaron que su expresión es dirigida por la ruta Dpp de manera independiente a la función de *sal*.

Para el grupo de genes candidatos a ser reprimidos (Sal+), observamos que en un 46% de los casos la expresión entre la situación silvestre y la mutante no cambia y que en un 14% ésta disminuye, al contrario de lo que sería de esperar según los datos de los microarrays. Para el 40% restante sí confirmamos un aumento de la expresión en toda la región central del ala, y en general este aumento fue muy drástico. En algunos casos encontramos este comportamiento también en genes para los que por hibridación *in situ* no se detecta expresión en el disco imaginal de ala (11%). Estos datos sugieren que una de las funciones de *sal* sería mantener inactivos genes que normalmente no se expresan en el ala, pero que se activan por señales que están presentes en su región central, incluyendo la propia señalización de la ruta Dpp. Además describimos 8 genes cuyo incremento de expresión depende de la activación de la ruta JNK. De éstos, 4 no presentan funciones conocidas, mientras que el resto tienen funciones tan dispares como respuesta inmune (CG6794), regulación de la vía de la insulina (CG15009), desarrollo de la línea germinal (CG1512) o la respuesta al ayuno (CG12505).

Las discordancias que encontramos entre los datos obtenidos en el microarray y la expresión *in situ* podrían explicarse en algunos casos por el cambio relativo de tamaño del ala con respecto al resto del disco que presentan los discos de ala mutantes para *sal*. Este sería el caso de los genes cuya expresión está regulada por Dpp de manera independiente de Sal. Por otra parte, es de destacar que ambos experimentos presentan limitaciones particulares que podrían manifestarse en forma de distintos niveles de resolución para cada gen utilizando estas dos técnicas. Concentrándonos en los mejores candidatos, aquéllos en los que visualizamos un cambio acorde con el detectado en los experimentos de microarray, hemos sido capaces de seleccionar 32 genes candidatos a ser reprimidos y 108 genes a ser activados por Sal. A partir de estos genes podremos seguir profundizando nuestros análisis para por un lado entender cómo median la función de Sal durante el desarrollo del ala, y por otro cómo éste es capaz de regular su transcripción.

Requerimiento funcional de genes seleccionados

Para poder asignar a los genes identificados algunas de las funciones descritas para Sal es necesario conocer cuáles son sus requerimientos durante el desarrollo del ala. Con este fin, realizamos un análisis fenotípico de la falta de función en el ala de cada uno de estos genes utilizando la expresión de sus correspondientes ARNi. Encontramos que en un 44% de los genes Sal– la falta de función causa cambios en el fenotipo de las alas. En la mayoría de casos (70%) estos cambios son compatibles con alteraciones en las funciones que media *sal*. Estos fenotipos incluyen la reducción del tamaño del ala, defectos en el patrón de venas y defectos en la estructura epitelial. Por el contrario, encontramos que sólo un 24% de los genes Sal+ modifican el fenotipo del ala. Este resultado es esperable puesto que parte de estos genes no se expresan en el ala (N; 11%). Además, estos genes son reprimidos por Sal, por lo que el análisis de su falta de función reflejaría funciones independientes a las de Sal. De esta manera, sería de esperar que fuera su expresión ectópica, y no su falta de

función, la que causara fenotipos en las alas similares a los de mutantes *sal*. Encontramos que la reducción de la expresión de 40 de estos genes *Sal*⁺ en un fondo genético de falta de función de *sal* no modifica el fenotipo. Sería necesario dirigir la expresión de estos genes al territorio central del ala y evaluar las consecuencias de su expresión ectópica.

Para los genes *Sal*[−] describimos un grupo de 34 que, por un lado son activados en respuesta a *Sal* (comprobado mediante hibridación *in situ*) y que además presentan requerimientos funcionales en la formación del ala relacionados con los de *sal*. Estos genes fueron considerados como los mejores candidatos a ser activados por *Sal* y mediar sus funciones en el ala (*SBC*[−]). Es destacable que 57 de los genes cuya expresión *in situ* cambia en respuesta a *Sal* no presentan un fenotipo de falta de función. Estos genes fueron descartados como mejores candidatos, pero sigue siendo cierto que su expresión depende de *Sal*, y podrían mediar sus funciones aunque nuestro abordaje experimental no haya permitido identificar sus requerimientos. Hay que tener en cuenta que este análisis consiste en una reducción de los niveles de ARNm que varía entre un 60-90% de la expresión de cada gen individual, y estas condiciones de falta de función no son siempre suficientes para revelar un requerimiento funcional. También puede que estos genes tengan funciones que sean suplidas por otros que no están siendo afectados.

Estudio de Ontología Génica.

Llevamos a cabo un estudio global de los genes identificados agrupándolos por sus características moleculares y buscando un enriquecimiento de las funciones biológicas asociadas a ellos. La agrupación de los genes identificados por sus características moleculares descubre que un gran número de estos genes carece de anotaciones funcionales. De esta manera desestimamos la función de cerca de un cuarto de los genes seleccionados por falta de información. Dentro de los grupos con función conocida los más representados corresponden a genes relacionados con la biología del ADN y con la señalización celular, lo que sugiere que la falta de *Sal* desencadena modificaciones en múltiples procesos que cambian por completo el estado transcripcional de las células. Cuando llevamos a cabo un análisis de enriquecimiento de categorías GO relacionadas con “procesos biológicos” para los diferentes grupos de genes seleccionados encontramos que cuanto más acotada es nuestra selección los términos GO enriquecidos están más relacionados con las funciones conocidas de *Sal*. Por ejemplo, entre los grupos de “seleccionados” y “*SBC*” se descartan los términos relacionados con la respuesta inmune pero permanecen los relacionados con la regulación del ciclo celular. Esta observación sugiere que los criterios de selección que hemos aplicado están bien enfocados hacia la identificación de mediadores de las funciones conocidas de *Sal*. Son de destacar también las diferencias que encontramos entre los genes activados y los reprimidos, estando los segundos más relacionados con el metabolismo Red-Ox, como ya encontrábamos en la clasificación de procesos moleculares, y con la regulación génica. Por el contrario, los genes activados aparecen más relacionados con procesos celulares tales como el ciclo y la muerte celular programada o el desarrollo de órganos y tejidos.

Posicionamiento de la vena L2

Nuestro abordaje experimental nos ha permitido identificar al gen *optix* como un mediador clave de la función de *sal* en la formación del patrón de venas. Así, encontramos que *Optix* es necesario para que la vena L2 se posicione correctamente y que *Sal* se comporte como un regulador negativo de su expresión, restringiendo su dominio de expresión a la región más anterior del disco de ala. Asimismo, encontramos que *Optix* reprime la expresión de *kni* a través de la región *EX* (Lunde et al., 2003), en la cual encontramos varios posibles dominios de unión a *Optix* conservados. Las relaciones funcionales entre *Sal* y *optix* y entre *Optix* y *kni* nos han permitido definir con más precisión los mecanismos reguladores a través de los cuales *Sal* participa en el posicionamiento de la vena L2, concluyendo que *Sal* acota el territorio de expresión de *kni* a través de la represión de *optix*.

En este trabajo también hemos identificado un posible regulador positivo de *kni* en la región presuntiva de la vena L2: el gen *al*. Este gen codifica para un factor de transcripción que se expresa en un dominio amplio del compartimento anterior, y sus mutaciones causan, entre otros fenotipos, la falta de la vena L2. Observamos que este defecto de vena L2 se debe a fallos en la expresión de *kni*, lo que hace de *Al* un buen candidato para actuar como activador de *kni*. Las relaciones identificadas entre *Al*, *Kni*, *Optix* y *Sal* nos permiten una descripción detallada de la regulación de *Kni* en el territorio presuntivo de la vena L2, precisando así el modelo que habían propuesto de Celis y Barrio (2000) en el que describen que los niveles de expresión *Sal* son los responsables de la regulación de *kni* en el territorio presuntivo de vena L2. En nuestro modelo, *Al* promueve la expresión de *kni* en la región anterior del disco imaginal de ala mientras que *Optix* la reprime en las células más anteriores (Figura 48). Debido a la represión de *optix* por *Sal*, se generaría un territorio en el que se expresa *Al* y no se expresa *Optix*, y sería en este dominio donde *kni* se expresaría en una franja de células, para completar este modelo se precisa de un represor que defina el límite anterior de la expresión de *kni*, un candidato podría ser *Mad* en combinación con *Shn* (Figura 48). Aunque *Kni* es el responsable que inicia el programa génico que lleva a la diferenciación de esta vena, todavía se desconoce cómo se relaciona su actividad con la expresión de las señales que en último término conducen a la activación de la ruta EGFR en estas células.

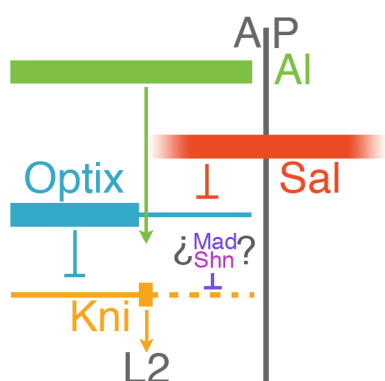


Figura 48. Regulación de la posición de la vena L2.

Representación esquemática del modelo propuesto de regulación de *kni* en la región de vena L2. *Al* (verde) promueve la expresión de *kni* (amarillo) en la región anterior (A) del disco de ala. *Optix* (azul) reprime la expresión de *kni* acotando su dominio de expresión. Además en la región central existiría algún represor de *Kni*, podría ser *Mad* en conjunción con *Shn* (Morado). *Sal* (rojo) se expresa en la región central del disco de ala y reprime la expresión de *optix*; de esta manera se define una región en la cual *Al* activa la expresión de *kni* y no hay represores que la impidan.

Regulación de la ruta JNK por Sal durante el desarrollo del ala.

El análisis de la expresión por hibridación *in situ* muestra que existe un grupo de genes (N+) que en condiciones normales no se expresan en el disco imaginal de ala y que en ausencia de Sal presentan altos niveles de expresión en la región central del disco. Como ya hemos comentado, este comportamiento nos sugiere que una de las funciones de Sal sería la de evitar la activación de ciertas dianas de las rutas de señalización que normalmente operan en esta región del disco (Figura 49).

Uno de los casos que se ajusta a este modelo es la ruta de señalización JNK, que en condiciones normales sólo se encuentra activa en las células encargadas de la eversión del disco durante la metamorfosis (Agnes et al., 1999). En nuestro caso, encontramos que la ruta JNK sigue una regulación del tipo N+, como había sido descrito anteriormente (Organista y de Celis, 2013), y que es activada por la ruta Dpp en la región central del ala. Ya que Dpp también activa a Sal, la presencia de Sal evitaría que se activara la ruta JNK en estas células reprimiendo la expresión de *egr*, el ligando de la ruta. La activación remanente de la ruta JNK que observamos cuando bloqueamos la actividad de la ruta Dpp sería debida a los daños epiteliales derivados de la sobre-expresión de Dad. Las relaciones entre las rutas Dpp y JNK en diferentes sistemas y condiciones experimentales son complejas y variables. Por ejemplo, Dpp promueve la activación de JNK en los bordes de contacto entre células con distintos niveles de señalización Dpp (Adachi-Yamada y O'Connor, 2002) y en la formación de las articulaciones de la pata (Manjon et al., 2007). También durante el desarrollo cardiaco se ha descrito que Dpp es capaz de promover la apoptosis a través de la activación de JNK (Yang y Su, 2011), mientras que en el cierre dorsal embrionario, donde se activan ambas rutas, se ha identificado que Dpp es capaz de inhibir la activación de *rpr*, y así parte de la señalización de JNK, a través de Shn.

Generalizando sobre la relación que observamos entre Sal, Dpp y la ruta JNK, podríamos decir que una de las funciones fundamentales de Sal sería la de modular las respuestas a la ruta Dpp, impidiendo o limitando parte de los procesos que ésta es capaz de desencadenar (Figura 49).

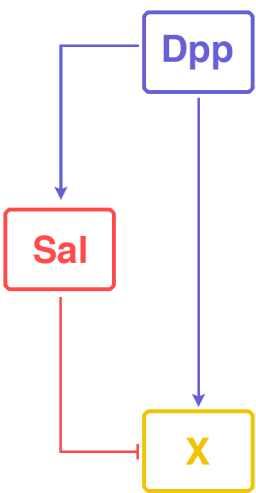


Figura 49. Sal modula la respuesta de la señalización de Dpp. En la región central del ala la ruta Dpp (morado) activa la expresión de Sal (rojo). La ruta Dpp también promueve la expresión de otros genes (X; amarillo) que no son necesarios durante el desarrollo del ala, y que Sal es capaz de modular por represión.

Búsqueda de regiones de ADN reconocidas por Sal.

Sal contiene dominios de dedos de Zn de unión al ADN pero no se conoce a través de qué secuencias se da dicha interacción. Para intentar identificar estas secuencias, es-

tudiamos la cromatina inmunoprecipitada por una proteína Salm-CFP sobre-expresada en el disco de ala. Este análisis mostró un gran número de regiones de ADN que podrían interaccionar con Salm, sin embargo entre las regiones identificadas no hemos sido capaces de encontrar secuencias enriquecidas; indicando que Salm no reconoce un sitio consenso igual en todas sus regiones de unión. Cabe la posibilidad de que la situación experimental empleada nos impida encontrar un motivo enriquecido; por ejemplo debido a que la proteína Salm-CFP compita con la proteína nativa por los sitios de unión y sus afinidades no sean equiparables, enmascarando la proteína nativa algunos sitios de unión. Asimismo, al analizar una condición de sobre-expresión podrían identificarse uniones que en condiciones silvestres no se producen con tanta probabilidad. Por otra parte, se ha descrito que en el genoma existen regiones que son reconocidas por numerosos factores de transcripción (>9), denominadas regiones HOT (Moorman et al., 2006). Las uniones a estas secuencias podrían ser funcionales, pero los factores de transcripción las reconocen mediante motivos diferentes a los que utilizan normalmente (Kvon et al., 2012). Parte de los picos de unión de Salm que describimos podrían corresponder a regiones HOT y esto dificultaría la búsqueda de un motivo consenso. La unión de Salm a numerosos sitios del genoma también podría corresponder a una función de Sal relacionada con el mantenimiento estructural de la cromatina, como se ha descrito para su ortólogo Sall1 (Netzer et al., 2001).

Como aproximación complementaria para identificar regiones de ADN funcionales en mediar la respuesta a Sal estudiamos en ensayos *in vivo* los entornos génicos de 47 candidatos seleccionados. Encontramos que existen tanto candidatos con pocos intrones y localizados en regiones de alta densidad génica (ver, *CG5096* o *GstE6*), como candidatos que presentan grandes regiones intrónicas y están localizados en entornos de baja densidad génica (*CG9850*, *NetA* o *Trim9*). En general los genes localizados en las regiones del primer tipo o no se expresan en el disco de ala (N) o lo hacen de manera generalizada (U), mientras que los localizados en regiones de baja densidad génica y/o con grandes intrones suelen presentar un patrón de expresión restringido (P). Para llevar a cabo la selección de la región de estudio utilizamos los datos de potenciadores identificados en trabajos previos (Jory et al., 2012), de los genes *ana*, *optix* y *NetA*. Cuando estudiamos si estas regiones responden a un cambio en Sal observamos cómo la expresión de gen reportero que dirigen no se altera. De los 44 genes restantes seleccionamos regiones que están conservadas evolutivamente localizadas 5' o en regiones intrónicas. Mediante este abordaje describimos 9 regiones de ADN que responden a la presencia de Sal de la misma manera. Sólo uno de estos casos (*CG30069*) sigue una regulación del tipo Sal–, mientras que los demás son genes reprimidos por Sal. Es de destacar el hecho de que estos genes se encuentren en lugares con alta densidad génica y en todos, a excepción de *CG15784*, hemos seleccionado toda la región 5' del gen hasta el gen más cercano, incluyendo en algunos casos la región 5' UTR (región no traducida del gen).

Realizamos una búsqueda de motivos comunes en las regiones que responden a *sal* dirigida a las secuencias donde es más probable que Sal se una según los datos de ATAC-seq (cedidos por el Dr. Gomez-Skarmeta). Tras subdividir cada una de estas 9 regiones en fragmentos que podrían interaccionar con Sal encontramos 2 motivos consenso. Esos motivos son ricos en bases A/T, lo que concuerda con los datos publicados tanto para Salr (Barrio et al., 1996) como para sus ortólogos de vertebrados Sall1 y Sall4 (Wu et al., 2006; Yamashita et al., 2007). No encontramos que estos motivos aparezcan de manera enriquecida cercanos a los genes que hemos descrito como dianas de Sal, sino repartidos por todo el genoma. Desafortunadamente, sólo el 4% de los picos de unión identificados en experimentos de ChIP presentan alguno de estos motivos, que además no se localizan en la cercanía de genes seleccionados como regulados por Sal.

El estudio exhaustivo de la región que dirige la expresión de *CG15784* demuestra que los dominios que median su activación y represión son solapantes. De esta forma, no encontramos ninguna región que al eliminarla reproduzca en condiciones normales para Sal el comportamiento observado en fondo de reducción de la expresión de *sal*. Sí encontramos 4 deleciones en las que no observamos expresión ectópica en fondo *sal⁻*, lo que sugeriría que la regulación de este gen por Sal es mediante un modelo de *enhanceoma*, en el que diferentes módulos independientes funcionando de manera sinérgica son necesarios para que la regulación se dé de manera correcta.

Con todos estos datos en la mano encontramos que Sal une al ADN en numerosos lugares reconociendo regiones ricas en A/T, y que también es capaz de interaccionar con la cromatina sin reconocer una secuencia específica. Para llevar a cabo su función como regulador de la transcripción seguramente tienen que reunirse varias características, entre las que la arquitectura de los lugares de unión, la asociación de diferentes módulos de reconocimiento y la presencia de otros reguladores transcripcionales pueden jugar un papel importante.

Modificaciones epigenéticas mediadas por Sal.

En el estudio de modificaciones epigenéticas en la cromatina encontramos un enriquecimiento significativo sólo en los candidatos a ser reprimidos por Sal (Sal+ y SBC+). De esta manera descartamos que los enriquecimientos encontrados se deban a un efecto del muestreo o a que Sal se encuentre preferentemente asociado a ciertas modificaciones de Histonas, ya en estos casos encontraríamos resultados parecidos para los genes activados y los reprimidos. El enriquecimiento con una significancia mayor ($p\text{-valor} < 0,001$) lo encontramos para la H3K9me3, una modificación que se asocia a la heterocromatina. Es por tanto posible que una de las maneras en las que Sal llevaría a cabo la represión transcripcional fuera promoviendo una conformación inaccesible en sus genes diana. Estos datos concuerdan tanto con el hecho de que estos genes están siendo reprimidos como con que en estudios previos se observara una asociación entre Sal y la heterocromatina (Sanchez et al.,

2011). Además, para el grupo de genes que hemos seleccionado como mejores candidatos (SBC+) encontramos otras marcas enriquecidas, aunque con p-valores más altos, como es la H3K16ac. Esta marca también está relacionada con la represión génica, y se ha visto que está relacionada con sitios de respuesta a Polycomb (Gelbart et al., 2009) y con la actividad de Sir2 (Chopra y Mishra, 2005), proteína que encontramos que forma complejo con Salm. Otras marcas que aparecen enriquecidas son la H3K36me3 y la H4K18ac, que están generalmente presentes en los lugares de inicio de la transcripción (TSS) y se podrían relacionar con activación transcripcional. El significado de este enriquecimiento en los genes Sal+ es por el momento desconocido, aunque puede que esté asociado a la expresión que encontramos para muchos de estos genes en fondo silvestre.

Para identificar otros componentes que participen en el proceso de regulación transcripcional en respuesta a Sal hemos llevado a cabo una aproximación genética, consistente en buscar condiciones de falta de función capaces de revertir los fenotipos causados por la expresión ectópica de Salm. Para llevar a cabo este estudio hemos utilizado una expresión ectópica de *salm* moderada, ya que su expresión ectópica a niveles altos impide el desarrollo del ala. Con este condicionante elegimos la línea *C5-Gal4*, a pesar de que sus efectos dirigiendo la expresión de ARNi para componentes de la maquinaria remodeladora de la cromatina son leves. En estas condiciones experimentales encontramos que sólo 6 de los 22 genes testados presentan modificaciones en el fenotipo del ala, que de manera general son débiles. En combinación con la expresión ectópica de Salm, encontramos cuatro genes cuya atenuación revierte el fenotipo de estas alas: *sap130* y *EMSY*, que codifican para unas proteínas que interaccionan con el complejo remodelador Sin3A (Spain et al., 2010), *caf1-55*, que codifica para una proteína de unión a nucleosomas, y que forma parte tanto del complejo Sin3A (Spain et al., 2010) como del complejo represivo Polycomb 2 (Tie et al., 2001). Esta proteína además tiene actividad metil-transferasa específica para la H3K27 (Czermin et al., 2002), una marca que se encuentra asociada a los sitios PRE al igual que H4K16ac, marca enriquecida en los genes SBC+. Por último identificamos en estos ensayos a *MEP-1* que revierte por completo el fenotipo de la expresión ectópica de Salm en el ala. La proteína MEP-1 tiene dominios de dedos de zinc C2H2 e interacciona con el complejo NuRD (Unhavaithaya et al., 2002). Es de destacar que tanto Sall1 como Sall4 de vertebrados son capaces de reclutar dicho complejo para llevar a cabo sus funciones como represores (Lauberth y Rauchman, 2006). De esta forma Salm podría participar en el reclutamiento de NuRD a través de una interacción con MEP-1, como se ha descrito para otros factores de transcripción (Reddy et al., 2010).

En resumen, tanto el enriquecimiento en ciertas marcas de la cromatina asociada a represión génica identificado en los genes Sal+ como el requerimiento de las proteínas Sap130, EMSY, Caf1-55 y MEP-1 para la función de Sal sugieren que esta proteína podría llevar a cabo su actividad represora interaccionando con diferentes complejos que reducen la accesibilidad de la cromatina y disminuyen su capacidad transcripcional.

CONCLUSIONES

1. La falta de Sal en el disco imaginal de ala provoca cambios globales en la expresión génica. Mediante el estudio de patrones de expresión hemos identificado 140 genes candidatos a ser dianas de Sal de los cuales 32 son reprimidos y 108 activados.
2. Hemos identificado 8 genes regulados por la activación ectópica de la ruta JNK en ausencia de Sal.
3. Describimos un grupo de 42 genes candidatos a ser activados por Sal cuya falta de función produce modificaciones en el fenotipo de las alas relacionadas con las funciones de Sal. Sin embargo, la reducción de la expresión de genes candidatos a ser reprimidos por Sal no modifica el fenotipo de la falta de Sal.
4. Hemos identificado el mecanismo por el que Sal regula la formación de la vena L2, y proponemos un modelo en el que Al regula la activación de *kni* en la región anterior del disco y Optix reprime su expresión en la zona más anterior; siendo Sal el responsable de acotar el límite posterior del dominio de expresión de *optix*.
5. La señalización de Dpp es necesaria para la activación ectópica de la ruta JNK que ocurre en ausencia de Sal.
6. Salm es capaz de interaccionar con la cromatina en numerosos sitios. Identificamos 9 módulos reguladores de ADN que responden a Sal, los cuales contienen 2 motivos enriquecidos en regiones A/T.
7. La actividad represora de Sal podría estar mediada por la modificación de la accesibilidad a la cromatina. Las proteínas Caf1-55, Sap130, EMSY y MEP-1, componentes de complejos remodeladores, son necesarias para que Salm lleve a cabo su función.
8. Salm y Sir2 forman parte de un mismo complejo proteico.

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi-Yamada, T. and O'Connor, M. B. (2002) 'Morphogenetic apoptosis: a mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients', *Dev Biol* 251(1): 74-90.
- Affolter, M. and Basler, K. (2007) 'The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation', *Nat Rev Genet* 8(9): 663-74.
- Agnes, F., Suzanne, M. and Noselli, S. (1999) 'The Drosophila JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis', *Development* 126(23): 5453-62.
- Arnosti, D. N. and Kulkarni, M. M. (2005) 'Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards?', *Journal of cellular biochemistry* 94(5): 890-8.
- Barrio, R. and de Celis, J. F. (2004) 'Regulation of spalt expression in the Drosophila wing blade in response to the Decapentaplegic signaling pathway', *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16): 6021-6.
- Barrio, R., Shea, M. J., Carulli, J., Lipkow, K., Gaul, U., Frömmer, G., Schuh, R., Jäckle, H. and Kafatos, F. C. (1996) 'The spalt-related gene of Drosophila melanogaster is a member of an ancient family, defined by the adjacent, region-specific homeotic gene spalt', *Dev Genes Evol* 206(206): 315-325.
- Baumann, M., Pontiller, J. and Ernst, W. (2010) 'Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview', *Molecular biotechnology* 45(3): 241-7.
- Biehs, B., Sturtevant, M. A. and Bier, E. (1998) 'Boundaries in the Drosophila wing imaginal disc organise vein-specific genetic programs', *Development* 125(125): 4245-4257.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K. (2007) 'An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9): 3312-7.
- Blankenberg, D., Von Kuster, G., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A. and Taylor, J. (2010) 'Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists', *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* Chapter 19: Unit 19 10 1-21.

- Boy, A. L., Zhai, Z., Habring-Muller, A., Kussler-Schneider, Y., Kaspar, P. and Lohmann, I. (2010) 'Vectors for efficient and high-throughput construction of fluorescent drosophila reporters using the PhiC31 site-specific integration system', *Genesis* 48(7): 452-6.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993) 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes', *Development* 118(118): 401-415.
- Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y. and Greenleaf, W. J. (2013) 'Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position', *Nature methods* 10(12): 1213-8.
- Butler, M. J., Jacobsen, T. L., Cain, D. M., Jarman, M. G., Hubank, M., Whittle, J. R. S., Phillips, R. and Simcox, A. (2003) 'Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the Drosophila wing disc using DNA oligonucleotide microarrays', *Development* 130(4): 659-670.
- Campbell, G. and Tomlinson, A. (1998) 'The roles of the homeobox genes *aristaless* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of Drosophila', *Development* 125(22): 4483-93.
- Campbell, G., Weaver, T. and Tomlinson, A. (1993) 'Axis specification in the developing Drosophila appendage: the role of *wingless*, *decapentaplegic*, and the homeobox gene *aristaless*', *Cell*(74): 1113-1123.
- Cantera, R., Luer, K., Rusten, T. E., Barrio, R., Kafatos, F. C. and Technau, G. M. (2002) 'Mutations in *spalt* cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of Drosophila melanogaster', *Development* 129(24): 5577-86.
- Celniker, S. E., Dillon, L. A., Gerstein, M. B., Gunsalus, K. C., Henikoff, S., Karpen, G. H., Kellis, M., Lai, E. C., Lieb, J. D., MacAlpine, D. M. et al. (2009) 'Unlocking the secrets of the genome', *Nature* 459(7249): 927-30.
- Chopra, V. S. and Mishra, R. K. (2005) 'To SIR with Polycomb: linking silencing mechanisms', *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 27(2): 119-21.
- Cohen, B., Simcox, A. A. and Cohen, S. M. (1993) 'Allocation of the thoracic imaginal primordia in the Drosophila embryo', *Development* 117(2): 597-608.
- Crozatier, M., Glise, B. and Vincent, A. (2002) 'Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the Drosophila wing; the pivotal role of *collier/knot* in the AP organiser', *Development* 129(18): 4261-4269.
- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M. and de Celis, J. F. (2009) 'A Gain of Function Screen Identifying Genes Required for Growth and Pattern Formation of the Drosophila melanogaster Wing', *Genetics* in press.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. and Pirrotta, V. (2002) 'Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Po-

lycomb sites', *Cell* 111(2): 185-96.

de Celis, J. F. (1998) 'Positioning and differentiation of veins in the Drosophila wing', *Int. J. Dev. Biol.* 42(42): 335-343.

de Celis, J. F. and Barrio, R. (2000) 'Function of the spalt/spalt-related gene complex in positioning the veins in the Drosophila wing', *Mech Dev* 91(1-2): 31-41.

de Celis, J. F. and Barrio, R. (2009) 'Regulation and function of Spalt proteins during animal development', *Int J Dev Biol* 53(8-10): 1385-98.

de Celis, J. F., Barrio, R. and Kafatos, F. C. (1996) 'A gene complex acting downstream of dpp in Drosophila wing morphogenesis', *Nature* 381(6581): 421-4.

Dietzl, G., Gheng, D., Schonerr, F., Su, K.C., Bariniva, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S. et al. (2007) 'A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila', *Nature* 448(448): 151-156.

Domingos, P. M., Mlodzik, M., Mendes, C. S., Brown, S., Steller, H. and Mollereau, B. (2004) 'Spalt transcription factors are required for R3/R4 specification and establishment of planar cell polarity in the Drosophila eye', *Development* 131(22): 5695-702.

Ebert, A., Lein, S., Schotta, G. and Reuter, G. (2006) 'Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in Drosophila', *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 14(4): 377-92.

Entchev, E. V., Schwabedissen, A. and Gonzalez-Gaitan, M. (2000) 'Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp', *Cell* 103(103): 981-991.

Estella, C., McKay, D. J. and Mann, R. S. (2008) 'Molecular integration of wingless, decapentaplegic, and autoregulatory inputs into Distalless during Drosophila leg development', *Dev Cell* 14(1): 86-96.

Ferreiro, M. J., Rodriguez-Ezpeleta, N., Perez, C., Hackenberg, M., Aransay, A. M., Barrio, R. and Cantera, R. (2012) 'Whole transcriptome analysis of a reversible neurodegenerative process in Drosophila reveals potential neuroprotective genes', *BMC Genomics* 13: 483.

Fristrom, D. and Fristrom, J. W. (1993) *The metamorphic development of the adult epidermis*: Cold spring harbor laboratory press.

Garcia Bellido, A. (1985) 'Cell lineages and genes', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 312: 101-128.

Garcia-Bellido, A. and de Celis, J. F. (1992) 'Developmental genetics of the venation pattern of Drosophila', *Annu. Rev. Gen.* 26(26): 275-302.

Gelbart, M. E., Larschan, E., Peng, S., Park, P. J. and Kuroda, M. I. (2009) 'Drosophila MSL complex globally acetylates H4K16 on the male X chromosome for dosage compensation', *Nature structural & molecular biology* 16(8): 825-32.

Goecks, J., Nekrutenko, A. and Taylor, J. (2010) 'Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences', *Genome Biology* 11(8): R86.

Gold, K. S. and Brand, A. H. (2014) 'Optix defines a neuroepithelial compartment in the optic lobe of the *Drosophila* brain', *Neural development* 9: 18.

Gomez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferre-Marco, D. and Modolell, J. (1996) 'Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes', *Cell* 85(1): 95-105.

Guichard, A., Biehs, B., Sturtevant, M. A., Wickline, L., Chacko, J., Howard, K. and Bier, E. (1999) 'rhomboid and Star interact synergistically to promote EGFR/MAPK signaling during *Drosophila* wing vein development', *Development* 126(12): 2663-76.

Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y. C., Laslo, P., Cheng, J. X., Murre, C., Singh, H. and Glass, C. K. (2010) 'Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities', *Mol Cell* 38(4): 576-89.

Hess, J., Angel, P. and Schorpp-Kistner, M. (2004) 'AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings', *Journal of Cell Science* 117(Pt 25): 5965-73.

Huang da, W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009a) 'Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists', *Nucleic Acids Research* 37(1): 1-13.

Huang da, W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009b) 'Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources', *Nature protocols* 4(1): 44-57.

Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T. and Miura, M. (2002) 'Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway', *The EMBO Journal* 21(12): 3009-18.

Jory, A., Estella, C., Giorgianni, M. W., Slattery, M., Laverty, T. R., Rubin, G. M. and Mann, R. S. (2012) 'A survey of 6,300 genomic fragments for cis-regulatory activity in the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*', *Cell reports* 2(4): 1014-24.

Junion, G., Spivakov, M., Girardot, C., Braun, M., Gustafson, E. H., Birney, E. and Furlong, E. E. (2012) 'A transcription factor collective defines cardiac cell fate and reflects lineage history', *Cell* 148(3): 473-86.

Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., van Berkum, N. L., Ebmeier, C. C., Goossens, J., Rahl, P. B., Levine, S. S. et al. (2010) 'Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture', *Nature* 467(7314): 430-5.

Kawakami, Y., Uchiyama, Y., Rodriguez Esteban, C., Inenaga, T., Koyano-Nakagawa, N., Kawakami,

- H., Marti, M., Kmita, M., Monaghan-Nichols, P., Nishinakamura, R. et al. (2009) 'Sall genes regulate region-specific morphogenesis in the mouse limb by modulating Hox activities', *Development* 136(4): 585-94.
- Kim, J., Sebring, A., Esch, J.J., Kraus, M.E., Vorwerk, K., Magee, J., Carroll, B.B. (1996) Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* 382(6587):133-8.
- Kirkpatrick, H., Johnson, K. and Laughon, A. (2001) 'Repression of dpp targets by binding of brinker to mad sites', *The Journal of biological chemistry* 276(21): 18216-22.
- Klein, T. (2001) 'Wing disc development in the fly: the early stages', *Current opinion in genetics & development* 11(4): 470-5.
- Kühnlein, R. P., Frö mmer, G., Friedrich, M., Gonzalez-Gaitán, M., Wever, A., Wagner-Bernholz, J. F., Gehring, W. J., Jäckle, H. and Schuh, R. (1994) 'spalt encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo', *Embo J* 13: 168-179.
- Kühnlein, R. P. and Schuh, R. (1996) 'Dual function of the region-specific homeotic gene spalt during *Drosophila* tracheal system development', *Development* 122(7): 2215-23.
- Kvon, E. Z., Stampfel, G., Yanez-Cuna, J. O., Dickson, B. J. and Stark, A. (2012) 'HOT regions function as patterned developmental enhancers and have a distinct cis-regulatory signature', *Genes Dev* 26(9): 908-13.
- Laemmli, U. K., Beguin, F. and Gujer-Kellenberger, G. (1970) 'A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation', *Journal of molecular biology* 47(1): 69-85.
- Lauberth, S. M. and Rauchman, M. (2006) 'A conserved 12-amino Acid motif in sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex', *J Biol Chem* 281(33): 23922-31.
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M. (1996) 'Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing', *Nature* 381: 387-393.
- Li, D., Tian, Y., Ma, Y. and Benjamin, T. (2004) 'p150(Sal2) is a p53-independent regulator of p21(WAF1/CIP)', *Mol Cell Biol* 24(9): 3885-93.
- Li, Y., Jiang, Y., Chen, Y., Karandikar, U., Hoffman, K., Chattopadhyay, A., Mardon, G. and Chen, R. (2013) 'optix functions as a link between the retinal determination network and the dpp pathway to control morphogenetic furrow progression in *Drosophila*', *Dev Biol* 381(1): 50-61.
- Liu, L., Souto, J., Liao, W., Jiang, Y., Li, Y., Nishinakamura, R., Huang, S., Rosengart, T., Yang, V. W., Schuster, M. et al. (2013) 'Histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1) protein is involved in Sal-like protein 4 (SALL4)-mediated transcriptional repression in hematopoietic stem cells', *The Journal of biological chemistry* 288(48): 34719-28.

- Lu, J., Jeong, H. W., Kong, N., Yang, Y., Carroll, J., Luo, H. R., Silberstein, L. E., Yupoma and Chai, L. (2009) 'Stem cell factor SALL4 represses the transcriptions of PTEN and SALL1 through an epigenetic repressor complex', *PloS one* 4(5): e5577.
- Lunde, K., Biehs, B., Nauber, U. and Bier, E. (1998) 'The knirps and knirps-related genes organize development of the second wing vein in *Drosophila*', *Development* 125(21): 4145-54.
- Lunde, K., Trimble, J. L., Guichard, A., Guss, K. A., Nauber, U. and Bier, E. (2003) 'Activation of the knirps locus links patterning to morphogenesis of the second wing vein in *Drosophila*', *Development* 130(2): 235-48.
- Manjon, C., Sanchez-Herrero, E. and Suzanne, M. (2007) 'Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for *Drosophila* leg morphogenesis', *Nature cell biology* 9(1): 57-63.
- Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. and Martinez-Arias, A. (1998) 'puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*', *Genes Dev* 12(4): 557-70.
- Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. and Garcia-Bellido, A. (2000) 'JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7888-93.
- Marty, T., Muller, B., Basler, K. and Affolter, M. (2000) 'Schnurri mediates Dpp-dependent repression of brinker transcription.', *Nature Cell Biol.* 2(10): 745--749.
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D. J., Buchman, S., Chen, C. Y., Chou, A., Ienasescu, H. et al. (2014) 'JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles', *Nucleic Acids Research* 42(Database issue): D142-7.
- McKay, D. J. and Lieb, J. D. (2013) 'A common set of DNA regulatory elements shapes *Drosophila* appendages', *Dev Cell* 27(3): 306-18.
- Miertus, J., Borozdin, W., Frece, V., Tonini, G., Bertok, S., Amoroso, A., Miertus, S. and Kohlhaase, J. (2006) 'A SALL4 zinc finger missense mutation predicted to result in increased DNA binding affinity is associated with cranial midline defects and mild features of Okihiro syndrome', *Hum Genet* 119(1-2): 154-61.
- Mohler, J., Seecoomar, M., Agarwal, S., Bier, E. and Hsai, J. (2000) 'Activation of knot specifies the 3-4 intervein region in the *Drosophila* wing', *Development* 127(127): 55-63.
- Mollereau, B., Dominguez, M., Webel, R., Colley, N. J., Keung, B., de Celis, J. F. and Desplan, C. (2001) 'Two-step process for photoreceptor formation in *Drosophila*', *Nature* 412(6850): 911-3.
- Moorman, C., Sun, L. V., Wang, J., de Wit, E., Talhout, W., Ward, L. D., Greil, F., Lu, X. J., White, K. P., Bussemaker, H. J. et al. (2006) 'Hotspots of transcription factor colocalization in the genome of

- Drosophila melanogaster*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 12027-32.
- Morris, S. A., Shibata, Y., Noma, K., Tsukamoto, Y., Warren, E., Temple, B., Grewal, S. I. and Strahl, B. D. (2005) 'Histone H3 K36 methylation is associated with transcription elongation in *Schizosaccharomyces pombe*', *Eukaryotic cell* 4(8): 1446-54.
- Mullor, J. L., Calleja, M., Capdevila, J. and Guerrero, I. (1997) 'Hedgehog activity, independent of Decapentaplegic, participates in wing disc patterning', *Development* 124(124): 1227-1237.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K. (1996) 'Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient', *Cell* 85(3): 357-68.
- Netzer, C., Rieger, L., Brero, A., Zhang, C. D., Hinzke, M., Kohlhasse, J. and Bohlander, S. K. (2001) 'SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, encodes a transcriptional repressor which interacts with TRF1/PIN2 and localizes to pericentromeric heterochromatin', *Hum Mol Genet* 10(26): 3017-24.
- Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Scully, S., Lacey, D. L. et al. (2001) 'Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development', *Development* 128(16): 3105-15.
- Organista, M. F. (2012) Funciones de las proteínas Spalt e identificación de sus genes diana durante el desarrollo del disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster* Departamento de Biología Molecular, vol. Biología. Madrid: UAM.
- Organista, M. F. and de Celis, J. F. (2013) 'The Spalt transcription factors regulate cell proliferation, survival and epithelial integrity downstream of the Decapentaplegic signalling pathway', *Biol Open* 2(1): 37-48.
- Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martin-Blanco, E. and Garcia-Bellido, A. (2004) 'Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade', *Dev Cell* 7(3): 387-99.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A. and Morata, G. (2004) 'Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*', *Development* 131(22): 5591-8.
- Ramos, A. I. and Barolo, S. (2013) 'Low-affinity transcription factor binding sites shape morphogen responses and enhancer evolution', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368(1632): 20130018.
- Reddy, B. A., Bajpe, P. K., Bassett, A., Moshkin, Y. M., Kozhevnikova, E., Bezstarosti, K., Demmers, J. A., Travers, A. A. and Verrijzer, C. P. (2010) 'Drosophila transcription factor Tramtrack69 binds MEP1 to recruit the chromatin remodeler NuRD', *Mol Cell Biol* 30(21): 5234-44.
- Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A. and Hafen, E. (1996) 'The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye', *Genes*

Dev 10(21): 2759-68.

Riethoven, J. J. (2010) 'Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators', *Methods in molecular biology* 674: 33-42.

Rios-Barrera, L. D. and Riesgo-Escovar, J. R. (2013) 'Regulating cell morphogenesis: the Drosophila Jun N-terminal kinase pathway', *Genesis* 51(3): 147-62.

Rubinstein, M. and de Souza, F. S. (2013) 'Evolution of transcriptional enhancers and animal diversity', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368(1632): 20130017.

Sanchez, J., Talamillo, A., Gonzalez, M., Sanchez-Pulido, L., Jimenez, S., Pirone, L., Sutherland, J. D. and Barrio, R. (2011) 'Drosophila Sal and Salr are transcriptional repressors', *Biochem J* 438(3): 437-45.

Sanchez, J., Talamillo, A., Lopitz-Otsoa, F., Perez, C., Hjerpe, R., Sutherland, J. D., Herboso, L., Rodriguez, M. S. and Barrio, R. (2010) 'Sumoylation modulates the activity of Spalt-like proteins during wing development in Drosophila', *J Biol Chem* 285(33): 25841-9.

Sandmann, T., Jakobsen, J. S. and Furlong, E. E. (2006) 'ChIP-on-chip protocol for genome-wide analysis of transcription factor binding in Drosophila melanogaster embryos', *Nature protocols* 1(6): 2839-55.

Seimiya, M. and Gehring, W. J. (2000) 'The Drosophila homeobox gene optix is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism', *Development* 127(9): 1879-86.

Seo, H. C., Curtiss, J., Mlodzik, M. and Fjose, A. (1999) 'Six class homeobox genes in drosophila belong to three distinct families and are involved in head development', *Mechanisms of Development* 83(1-2): 127-39.

Simcox, A. (1997) 'Differential requirement for EGF-like ligands in Drosophila wing development', *Mech Dev* 62(62): 41-50.

Slattery, M., Zhou, T., Yang, L., Dantas Machado, A. C., Gordan, R. and Rohs, R. (2014) 'Absence of a simple code: how transcription factors read the genome', *Trends In Biochemical Sciences* 39(9): 381-99.

Spain, M. M., Caruso, J. A., Swaminathan, A. and Pile, L. A. (2010) 'Drosophila SIN3 isoforms interact with distinct proteins and have unique biological functions', *The Journal of biological chemistry* 285(35): 27457-67.

Sturtevant, M. A., Roark, M. and Bier, E. (1993) 'The Drosophila rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway', *Genes Dev* 7(7): 961-973.

- Teleman, A. A. and Cohen, S. M. (2000) 'Dpp gradient formation in the Drosophila wing maginal disc', *Cell* 103(103): 971-980.
- Tie, F., Furuyama, T., Prasad-Sinha, J., Jane, E. and Harte, P. J. (2001) 'The Drosophila Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3', *Development* 128(2): 275-86.
- Tsuneizumi, K., Nakayama, T., Kamoshida, Y., Koernberg, T., Christian, J. and Tabata, T. (1997) 'Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in Drosophila wing development', *Nature* 389(389): 627-631.
- Unhavaithaya, Y., Shin, T. H., Miliaras, N., Lee, J., Oyama, T. and Mello, C. C. (2002) 'MEP-1 and a homolog of the NURD complex component Mi-2 act together to maintain germline-soma distinctions in *C. elegans*', *Cell* 111(7): 991-1002.
- Vaquero-Sedas, M. I., Luo, C. and Vega-Palas, M. A. (2012) 'Analysis of the epigenetic status of telomeres by using ChIP-seq data', *Nucleic Acids Research* 40(21): e163.
- Vervoort, M., Crozatier, M., Valle, D. and Vincent, A. (1999) 'The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the Drosophila wing', *Current Biology* 9(9): 632-9.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Peng, W., Zhang, M. Q. et al. (2008) 'Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome', *Nat Genet* 40(7): 897-903.
- Weake, V. M. and Workman, J. L. (2010) 'Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms', *Nature reviews. Genetics* 11(6): 426-37.
- Wong, C. C., Gaspar-Maia, A., Ramalho-Santos, M. and Reijo Pera, R. A. (2008) 'High-efficiency stem cell fusion-mediated assay reveals Sall4 as an enhancer of reprogramming', *PloS one* 3(4): e1955.
- Wu, Q., Chen, X., Zhang, J., Loh, Y. H., Low, T. Y., Zhang, W., Zhang, W., Sze, S. K., Lim, B. and Ng, H. H. (2006) 'Sall4 Interacts with Nanog and Co-occupies Nanog Genomic Sites in Embryonic Stem Cells', *J Biol Chem* 281(34): 24090-4.
- Wu, X., Vasisht, V., Kosman, D., Reinitz, J. and Small, S. (2001) 'Thoracic patterning by the Drosophila gap gene hunchback', *Dev Biol* 237(1): 79-92.
- Wu, Z., Cheng, K., Shi, L., Li, Z., Negi, H., Gao, G., Kamle, S. and Li, D. (2015) 'Sal-like protein 2 upregulates p16 expression through a proximal promoter element', *Cancer science* 106(3): 253-61.
- Yamashita, K., Sato, A., Asashima, M., Wang, P. C. and Nishinakamura, R. (2007) 'Mouse homolog of SALL1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, binds to A/T-rich sequences in pericentric heterochromatin via its C-terminal zinc finger domains', *Genes Cells* 12(2): 171-82.

Yang, J., Chai, L., Liu, F., Fink, L. M., Lin, P., Silberstein, L. E., Amin, H. M., Ward, D. C. and Ma, Y. (2007) 'Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25): 10494-9.

Yang, S. A. and Su, M. T. (2011) 'Excessive Dpp signaling induces cardiac apoptosis through dTAK1 and dJNK during late embryogenesis of *Drosophila*', *Journal of biomedical science* 18: 85.

AGRADECIMIENTOS

Las tesis van firmadas por un sólo autor, pero la mayoría de las partes de esta tesis merecen varios, así que veo necesario dejar en letra impresa lo agradecida que me he sentido en tantas ocasiones a lo largo de estos años. Aunque sin duda espero que leer estas páginas no sea necesario para que se sepa.

Lo primero agradecer a quien sí que también firma esta tesis, no sólo por abrirme las puertas de un lugar de trabajo envidiable y permitir mi financiación, sino por tener la paciencia suficiente como para no desesperar con mi ritmo natural.

A mi compañera de la comunidad Spalt, con la cual he compartido mucho más que un maravilloso trabajo y que siempre ha estado para decirme “Dale Caña Michael” sin importar cuantos husos horarios nos separen.

A Ana y a Nuria, la primera no sólo por adoptarme y tener siempre un buen gesto guardado tanto en lo profesional como en lo personal, y la segunda por estar siempre más que dispuesta a todo, sino porque además se han hecho maestras del clonaje junto a mí.

Todos ellos merecen que su nombre figure en este manuscrito junto al mío, así como al servicio de transgénesis, sin el cual este trabajo ni siquiera existiría, gracias chicas: a una por enseñarme a inyectar y a la otra por tantas conversaciones de lo más variadas.

Además hay mucha más gente a la que estoy agradecida por todo lo que me ha enseñado, prestado y dado sin compromiso; quienes me han acompañado, aconsejado y apoyado haciendo que estos años los recuerde con una sonrisa.

A mi compañera de lecho habitual por enseñarme casi todo lo que sé hacer cerca de las pipetas y dejarse robar tanto.

Al “Tinto Team”, por todos los tintos, y lo que no son tintos, compartidos, además a una por ser una vecina ejemplar y a la otra por sus sondas maravillosas, nuestras sesiones cinéfilas y facilitarme muchas veces la vida.

A mis compañeros de ring por sacar una sonrisa aunque sea entre charcos de sudor y por todas las conversaciones gastronómicas.

A todos con los que he compartido este espacio n-dimensional, o nicho, desde Martín y su particular estilo de vida del que tanto he aprendido, Cris y Marta por soportar de cerca el caos que me rodea y las pelusas tras mi pantalla, Ana no sólo por proveerme de toda la cafeína necesaria y amenizarme con su voz en OFF, sino por abrirme las puertas de la docencia, Carlos que siempre ha estado a mi espalda para revelarme toda su sabiduría sobre la regulación génica a cambio de un beso, David toda una “nueva” adquisición que siempre tiene una sonrisa preparada. Hasta todos los estudiantes que siempre han estado por aquí dándole un aire rejuvenecedor a estos escritorios, incluso al que me ha intentado colonizar colocando su cepillo de dientes de bandera, y en especial a Paula, Almu y Julia.

A nuestros sucesores, que aunque son menos de los que deberían, tienen a la mejor de las representantes y llena el laboratorio con su risa floja.

A Antonio Baonza por su manera de hacerse preguntas, tan enriquecedora, y a todo su laboratorio. A las primigenias, que han sido unas grandes compañeras, me han cuidado y alimentado, brindándome ahora sus hogares a ambos lados del Pacífico. Y a las nuevas generaciones, desde el venido desde lejos a todos los estudiantes, y los que ya no lo son, que tanto tiempo han compartido con nosotros, forman ahora un nuevo laboratorio digno de sus antecesores.

A Federico Mayor y todo su laboratorio por abrirme las puertas desde el principio, todos los reactivos prestados y su sabiduría bioquímica y proteica.

A Mar Ruiz y Marta, las que me enseñaron muchísimo en mis orígenes en este laboratorio y no dejan de sorprenderme con su orden y trabajo bien hecho.

A todos los servicios que componen este centro, en especial a las chicas que nutren a todas nuestras moscas, a los de microscopía confocal que han estado allí cuando pensaba que lo había roto todo, y a genómica. También al servicio de secuenciación del parque científico por todo el trabajo que me han solucionado.

A todo el departamento “DDD” en general, por devolver los saludos por los pasillos, escuchar siempre que lo he necesitado, por esas conversaciones en la fly y seguir compartiendo allende estas puertas. Y a su secretaria, por supuesto, que aunque ahora haya “descendido” a la zona noble siempre está presente para echar una mano que se agradece mucho.

También tengo mucho que agradecer a todos aquellos que no componen mi ambiente laboral y que en estos años me han dado el apoyo necesario para disfrutar de esta etapa.

A mi familia, tanto al núcleo familiar estricto de mis padres y hermano, que no sólo son, en parte, responsables de mi manera de preguntarme las cosas sino que además sé que, a su manera particular, tienen siempre un ojo puesto en mí para cuando haga falta; y también al núcleo más “laxo”, mi abuela, a la que he dedicado esta tesis, mis tíos y primas que también andan siempre pendientes y

compiten por alimentarme lo mejor posible.

A la “chupipandi”, a la de toda la vida y a la extensa, por estar ahí cuando yo no estaba y acompañarme en mis francachelas, tengo una mención especial a la facción madrileña y a la que impide que me vuelva una descartada.

A mis compañeras de juegos por esas sesiones liberadoras de juegos de mesa que no llegamos a entender del todo.

A las chicas del softball por convertirme en deportista de élite, cambiarme el nombre y adoptarme en su seno sin ningún miramiento.

A mis compañeros de piso (pasados y presentes) por hacer un hogar junto a mí.

A quien está al otro lado del buzón por corresponder más allá de la correspondencia.

Y por supuesto para con quien durante tanto tiempo anduve con su mismo paso, por ser mi apoyo en tantísimas ocasiones y hacerme ver las cosas desde otros ojos.

A todos vosotros y a los que me dejo en el tintero por el desgaste neuronal de estos momentos, muchísimas gracias porque hacéis que esa palabra se quede corta.

ANEXOS

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figuras

Figura Suplementaria 1. Hibridaciones *in situ* de los genes Sal- que presentan cambios.

Figura Suplementaria 2. Hibridaciones *in situ* de los genes Sal- seleccionados de Organista 2012 que se expresan con patrón restringido.

Figuras Suplementarias 3 y 4. Hibridaciones *in situ* de los genes Sal- seleccionados de Organista 2012 que se expresan de manera generalizada.

Figura Suplementaria 5. Hibridaciones *in situ* de los genes Sal+ que presentan cambios.

Figura Suplementaria 6. Hibridaciones *in situ* de los genes Sal+ seleccionados de Organista 2012 que presentan cambios.

Figuras Suplementarias 7 y 8. Hibridaciones *in situ* de los genes Sal+ que no presentan cambios.

Figura Suplementaria 9. Hibridaciones *in situ* de los genes Sal+ que no presentan cambios o disminuyen su expresión.

Figura Suplementaria 10. Estudio por hibridación *in situ* de la expresión ectópica mediada por JNK en la condición de atenuación de *sal*.

Figura Suplementaria 11. Requerimiento funcional de los genes Sal- para el desarrollo del ala.

Figura Suplementaria 12. Requerimiento funcional de los genes Sal+ para el desarrollo del ala.

Tablas

Tabla Suplementaria 1. Líneas de sobre-expresión de ARNi utilizadas.

Tabla Suplementaria 2. EST y cebadores utilizados para la generación de sondas.

Tabla Suplementaria 3. Cebadores utilizados para el clonaje de módulos reguladores de ADN.

Tabla Suplementaria 4. Datos estadísticamente significativos de los experimentos de microarray.

Tabla Suplementaria 5. Datos obtenidos del ensayo de ChIP-on-chip por FDR1.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

Martín M, Organista MF, de Celis JF (2016) Structure of developmental gene regulatory networks from the perspective of cell fatedetermining genes. *Transcription*, DOI: 10.1080/21541264.2015.1130118

Organista MF, **Martín M**, de Celis JM, Barrio R, López-Varea A, Esteban N, Casado M, de Celis JF (2015) The Spalt transcription factors generate the transcriptional landscape of the *Drosophila melanogaster* wing pouch central región. *PloS Genet* 11(8): e1005370.

Además, durante el desarrollo de esta Tesis, el doctorando ha participado en las siguientes publicaciones:

García-Guerra, L; Vila-Bedmar, R; Carrasco-Rando, M; Cruces-Sando, M; **Martín, M**; Ruiz-Gomez, A; Ruiz-Gomez, M; Lorenzo, M; Fernández-Veledo, S; Mayot Jr., F; Murga, C; Nieto-Vazquez, I. (2014) Skeletal muscle myogenesis is regulated by G protein-coupled receptor Kinase 2. *JMBC* 6(4), 299–311

Molnar, C; Resnik-Docampo, M; F. Organista, M; **Martín, M**; F. Hevia, C and de Celis JF. (2011). Signalling pathways in development and human disease: A *Drosophila* wing perspective. *Genetic Disease*. ISBN 978-953-308-96-7

Molnar C, Ruiz-Gomez A, **Martín M**, Rojo-Berciano S, Mayor F, de Celis JF (2011). Role of the *Drosophila* non-visual β -arrestin kurtz in hedgehog signaling. *PLoS Genet*. 7(3): e1001335